UNIVERSITAT DE BARCELONA

Impacto de los factores de riesgo cardiovascular en las células madre de tejido adiposo

Maria Teresa Béjar Serrano

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

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

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (**www.tdx.cat**) service and by the UB Digital Repository (**diposit.ub.edu**) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

UNIVERSITAT DE BARCELONA

UNIVERSIDAD DE BARCELONA

FACULTAD DE FARMACIA Y CIENCIAS DE LA ALIMENTACIÓN

PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOMEDICINA

Maria Teresa Béjar Serrano

IMPACTO DE LOS FACTORES DE RIESGO CARDIOVASCULAR EN LAS CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES DERIVADAS DE TEJIDO ADIPOSO

TESIS DOCTORAL

2016

UNIVERSIDAD DE BARCELONA

Facultad de Farmacia y Ciencias de la Alimentación

Programa de Doctorado en Biomedicina

Impacto de los factores de riesgo cardiovascular en las células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo

Memoria presentada por:

Maria Teresa Béjar Serrano

Para optar al título de Doctor por la Universidad de Barcelona

Centro de Investigación Cardiovascular (CSIC-ICCC)

Institut Català de Ciències Cardiovasculars

La directora,	El tutor,	La doctoranda,
Prof. Lina Badimon Maestro	**Prof. Francesc Villarroya Gombau**	**Maria Teresa Béjar Serrano**

Barcelona, 2016

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS.....XIII
ÍNDICE DE TABLAS.....XVII
ABREVIATURAS XXI
RESUMEN.....XXIX
I. INTRODUCCIÓN.....1
1. LAS ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES 1
1.1 Epidemiología de las enfermedades cardiovasculares 1
1.2 Aterosclerosis 2
1.2.1 Estructura de la pared arterial.....2
1.2.2 Desarrollo de la lesión aterosclerótica 3
1.3 Angiogenesis en la enfermedad cardiovascular.....6
2. FACTORES DE RIESGO CARDIOVASCULAR 8
2.1 Acumulación de factores de riesgo cardiovascular..... 11
2.2 Estimación y prevención del riesgo cardiovascular..... 12
2.3 Trasplante de médula ósea y riesgo cardiovascular asociado 14
3. DIABETES..... 16
3.1 Prevalencia de la diabetes..... 16
3.2 Clasificación..... 18
3.2.1 Diabetes tipo 1 18
3.2.2 Diabetes tipo 2 19
3.2.3 Otros tipos de diabetes 20
4. TEJIDO ADIPOSO..... 21
4.1 Tejido adiposo marrón 22
4.2 Tejido adiposo blanco 22
4.2.1 Tejido adiposo subcutáneo *vs.* visceral 23
4.2.2 Tejido adiposo epicárdico y perivascular coronario 25
4.3 Tipos celulares del tejido adiposo blanco 28
4.4 Inflamación del tejido adiposo..... 31
5. CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES DERIVADAS DE TEJIDO ADIPOSO 34

5.1 Localización 35
5.2 Fenotipo..... 36
5.3 Efectos inmunomoduladores 39
5.4 Efectos pro-angiogénicos 39
5.5 Uso terapéutico 41
5.6 Diferencias entre ASC de distintas localizaciones adiposas 43
5.7 Efecto de los factores de riesgo sobre las células madre mesenquimales..... 43

6. VÍAS DE SEÑALIZACIÓN.....45

6.1 Notch 45

7. ESTADO DE LA CUESTIÓN.....48

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....53

III. MATERIALES Y MÉTODOS.....57

1. NOMENCLATURA.....57

2. MODELO ANIMAL 57

2.1 Condiciones de estabulación..... 59
2.2 Obtención de las muestras de sangre 60
2.3 Obtención del tejido adiposo 60

3. MUESTRAS DE PACIENTES 62

3.1 Obtención del tejido adiposo 62
3.2 Análisis histológico de las arterias coronarias..... 63

4. CULTIVO DE LAS ASC.....65

4.1 Aislamiento..... 65
4.2 Condiciones de cultivo..... 66
4.3 Obtención del medio condicionado 66

5. OTROS TIPOS CELULARES.....67

5.1 HUVEC..... 67
5.2 VSMC 67

6. ENSAYOS DE BIOLOGÍA CELULAR 67
6.1 Citometría de flujo 67
6.2 Viabilidad y proliferación celular 69
6.3 Cinética de crecimiento celular 70
6.4 Diferenciación celular in vitro 70
6.4.1 Diferenciación adipogénica 70
6.4.2 Diferenciación osteogénica 71
6.4.3 Diferenciación endotelial 73
6.5 Ensayo de migración in vitro 73
6.6 Tinción de membrana celular en cultivo 74
6.7 Angiogénesis in vitro 76
7. MODULACIÓN DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN NOTCH 77
7.1 Inhibición de Notch mediante DAPT 77
7.2 Activación de Notch mediante PEITC 77
8. ANGIOGÉNESIS IN VIVO 78
8.1 Determinación del contenido en hemoglobina 79
8.2 Detección de vasos sanguíneos por inmunofluorescencia 80
9. TRASPLANTE DE MÉDULA ÓSEA 80
9.1 Acondicionamiento de los receptores 80
9.2 Extracción de la médula ósea 81
9.3 Trasplante de la médula ósea 81
10. DETERMINACIÓN DE LÍPIDOS 81
10.1 Extracción lipídica 81
10.2 Cromatografía en capa fina 82
11. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS 82
11.1 Cuantificación de IL-1 beta y TNF αlpha 82
11.2 Cuantificación de la actividad de TF 83
11.3 Cuantificación de los niveles de CCL2 83

12. SILENCIAMIENTO DE LA EXPRESIÓN DE TF 83

13. ANÁLISIS DE LOS NIVELES DE RNA MENSAJERO 84

13.1 Obtención del RNA celular 84

13.2 Cuantificación del RNA 85

13.3 Síntesis del DNA complementario 85

13.4 PCR a tiempo real 86

13.5 Cuantificación 87

13.6 PCR Array 87

13.7 Análisis *in silico* de los datos de expresión génica..... 89

IV. RESULTADOS.....93

ARTÍCULO 1 93

Notch signaling pathway activation in normal and hyperglycemic rats differs in the stem cells of visceral and subcutaneous adipose tissue

ARTÍCULO 2. 116

Systems biology approach to identify alterations in the stem cell reservoir of subcutaneous adipose tissue in a rat model of diabetes: effects on differentiation potential and function

ARTÍCULO 3. 143

Inhibition of Notch rescues the angiogenic potential impaired by cardiovascular risk factors in epicardial adipose stem cells

ARTÍCULO 4.....158

Bone marrow cell transplant from donors with cardiovascular risk factors increases the pro-atherosclerotic phenotype in the recipients

ARTÍCULO 5.....180

Cardiovascular risk factors regulate the cross-talk of coronary perivascular adipose-derived stem cells with vascular cells

V. DISCUSIÓN 211

VI. CONCLUSIONES.....235

VII. BIBLIOGRAFÍA.....239

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Causas de muerte en España durante el año 2014.....1
Figura 2. Estructura de la pared arterial.. 3
Figura 3. Desarrollo de la placa aterosclerótica.....5
Figura 4. Tabla SCORE. 13
Figura 5. Incidencia acumulada de eventos cardiovasculares después de un trasplante de médula ósea. 15
Figura 6. Mapa mundial de diabetes en adultos.....16
Figura 7. Estimación de prevalencia de diabetes.....17
Figura 8. Cortes histológicos de tejido adiposo blanco y marrón.....21
Figura 9. Distribución de los principales depósitos de tejido adiposo blanco..23
Figura 10. Distribución de los diferentes tejidos adiposos abdominales. 24
Figura 11. Apariencia macroscópica del tejido adiposo epicárdico.....26
Figura 12. Inflamación del tejido adiposo.....32
Figura 13. ASC de tejido adiposo coronario perivascular humano.....35
Figura 14. Tinción seriada de una arteria de tejido adiposo.....36
Figura 15. Potencial de diferenciación de las ASC.. 38
Figura 16. Formación de redes vasculares en co-cultivos.....40
Figura 17. Ensayos clínicos en terapia celular registrados en 2014.....42
Figura 18. Mecanismo de acción de la vía de señalización Notch.. 46
Figura 19. Evolución del peso y la glucosa en sangre de las ratas ZC y ZDF 59
Figura 20. Distribución del tejido adiposo blanco en la rata 61
Figura 21. Obtención de tejido adiposo perivascular coronario.....62
Figura 22. Estructura del sustrato MTS.....69
Figura 23. Tinción de lípidos Oil Red O 71
Figura 24. Tinción de calcio Alizarin Red.....73
Figura 25. Procedimiento de siembra en placas Ibidi Culture-Insert.....74
Figura 26. Tinción de células en cultivo 75
Figura 27. Formación de estructuras tubulares in vitro.....77
Figura 28. Ratón Balb/c-nu. Fuente: Janvier Labs.....78

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Estimaciones de Diabetes para los años 2015 y 2040..... 17

Tabla 2. Criterios de diagnóstico para la diabetes, IGT e IFG 18

Tabla 3. Adipoquinas liberadas por el tejido adiposo blanco. 30

Tabla 4. Principales marcadores de superficie en la identificación de las ASC.. 37

Tabla 5. Comparativa entre las ratas Zucker Diabetic Fatty (ZDF) y los controles delgados normoglucémicos (ZC). 58

Tabla 6. Anticuerpos utilizados en ensayos de inmunofluorescencia 64

Tabla 7. Anticuerpos utilizados en citometría de flujo. 68

Tabla 8. Medios de diferenciación adipogénica y osteogénica 72

Tabla 9. Reactivos utilizados en la transcripción reversa del RNA..... 85

Tabla 10. Programa utilizado en la síntesis de DNA complementario..... 86

Tabla 11. Reactivos utilizados en la PCR 87

Tabla 12. Programa de amplificación utilizado en la PCR..... 87

Tabla 13. Reactivos utilizados en la transcripción reversa del RNA para el PCR Array 88

Tabla 14. Reactivos utilizados en el PCR Array 88

Tabla 15. Programa de amplificación utilizado en el PCR Array 89

ABREVIATURAS

AGL	Ácidos grasos libres
AHA	*American heart association* Asociación americana del corazón
ALP	*Alkaline phosphatase* Fosfatasa alcalina
ASC	*Adipose-derived stem cells* Células madre derivadas de tejido adiposo
bFGF	*Basic fibroblast growth factor* Factor de crecimiento de fibroblastos básico
BGLAP	*Bone gamma-carboxyglutamate (Gla) protein* / *Osteocalcin* Proteína gamma-carboxiglutamato de hueso / Osteocalcina
CCL2	*C-C motif chemokine ligand 2* Citoquina ligando motivo C-C 2
cDNA	*Complementary deoxyribonucleic acid* Ácido desoxirribonucleico complementario
Ct	*Cycle threshold* Ciclo umbral
DAPT	N-[N-(3,5-Difluorofenacetil)-L-alanil]-S-fenilglicina t-butil éster
DMEM	*Dulbecco's modified Eagle's medium*
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	*Deoxyribonucleic acid* Ácido desoxirribonucleico
FRCV	Factores de riesgo cardiovascular
FXR/RXR	Farnesoid X Receptor/Retinoid X Receptor Receptor X farnesoide/Receptor X retinoide
ECGS	*Endothelial cell growth supplement* Suplemento de crecimiento de células endoteliales
ELISA	*Enzyme-linked immunosorbent assay* Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas

EPC	*Endothelial progenitor cells* Células progenitoras endoteliales
FABP4	*Fatty-acid binding protein 4* Proteína de unión a ácidos grasos 4
FGF	*Fibroblast growth factor* Factor de crecimiento fibroblástico
FITC	*Fluorescein isothiocyanate* Isotiocianato de fluoresceina
GAPDH	*Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
HDL	*High density lipoproteins* Lipoproteína de alta densidad
HUVEC	*Human umbilical vein endothelial cells* Células endoteliales humanas de vena umbilical
kDa	Kilodaltons
KO	Knockout
IBMX	3-isobutil-1-metilxantina
IDF	*International Diabetes Federation* Federación internacional de diabetes
IFATS	*International Federation for Adipose Therapeutics and Science* Federación internacional para la terapia y la ciencia adiposa
IFG	*Impaired fasting glucose* Glucemia de ayuno anormal
IGT	*Impaired glucose tolerance* Intolerancia anormal a la glucosa
IL	*Interleukin* Interleucina
IL-1β	*Interleukin 1 beta* Interleucina 1 beta
IMC	Índice de masa corporal

INE	Instituto nacional de estadística
IPA	Ingenuity pathway analysis
ISCT	*International Society for Cellular Therapy* Sociedad internacional para la terapia celular
LAD	*Lateral anterior descending* Lateral anterior descendente
LDL	*Low density lipoproteins* Lipoproteínas de alta densidad
LPL	*Lipoprotein lipase* Lipoproteína lipasa
mRNA	Messenger ribonucleic acid Ácido ribonucleico mensajero
MSC	*Mesenchymal Stem Cells* Células madre mesenquimales
MTS	3-(4,5,dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxi-fenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio
NICD	*Notch intracellular domain* Dominio intracelular Notch
OCT	*Optimal Cutting Temperature compound* Compuesto para temperatura óptima de corte
OMS	Organización mundial de la salud
PAI-1	*Plasminogen activator inhibitor 1* Inhibidor del activador de plasminógeno 1
PBS	*Phosphate buffered saline* Tampón fosfato salino
PDT	*Population doubling time* Tiempo de duplicación de la población
PE	*Phycoerythrin* Ficoeritrina

PECAM-1	*Platelet endothelial cell adhesion molecule* Molécula de adhesión endotelial plaquetaria
PEITC	*Phenethyl isothiocyanate* Isotiocianato de fenetilo
PCR	*Polymerase chain reaction* Reacción en cadena de la polimerasa
PDGF	*Platelet-derived growth factor* Factor de crecimiento derivado de las plaquetas
PPARγ	*Peroxisome proliferator activated receptor gamma* Receptor gamma activado por proliferador de peroxisomas
RNA	Ácido ribonucleico
RNasa	Ribonucleasa
RPLP0	*Ribosomal Protein, Large, P0* Proteína ribosomal grande P0
SCORE	*Systematic coronary risk evaluation* Evaluación sistemática del riesgo coronario
siRNA	*Small interfering ribonucleic acid* Ácido ribonucleico pequeño de interferencia
SFB	Suero fetal bovino
SPP1	*Secreted phosphoprotein 1 / Osteopontin* Fosfoproteína secretada 1 / Osteopontina
SVF	*Stromal vascular fraction* Fracción vascular del estroma
TF	*Tissue factor* Factor tisular
TGFβ	*Transforming growth factor beta* Factor de crecimiento transformante beta
TNFα	*Tumor necrosis factor alpha* Factor de necrosis tumoral alfa

VEGF	*Vascular endothelial growth factor* Factor de crecimiento endotelial vascular
VEGFR1/2	*Vascular endothelial growth receptor 1/2* Receptor 1/2 de factor de crecimiento endotelial vascular
VSMC	*Vascular smooth muscle cells* Células musculares lisas vasculares
VWF	*Von Willebrand Factor* Factor von Willebrand
ZC	Zucker control
ZDF	*Zucker Diabetic Fatty* Zucker diabéticas obesas

RESUMEN

Las enfermedades cardiovasculares se desarrollan como consecuencia de la interacción entre factores genéticos y ambientales. Los factores de riesgo cardiovascular son una serie de condiciones que favorecen la aparición de eventos cardiovasculares, e incluyen la obesidad, la diabetes, la dislipemia y la edad entre otros. En los últimos años, la investigación de los mecanismos responsables del desarrollo de enfermedad cardiovascular ha tenido como importante objeto de estudio el tejido adiposo, ya que además de jugar un papel crucial en la regulación de la homeostasis energética, ha demostrado actuar como un potente órgano endocrino, y ser una fuente de células madre mesenquimales adultas (ASC). Se trata de células multipotentes, de fácil obtención, con propiedades inmunomoduladoras y con la capacidad de diferenciarse a múltiples linajes celulares. Por estas características, las ASC se consideran un candidato ideal para su uso en terapia celular y son objeto de numerosos estudios en medicina regenerativa. Sin embargo, es poco conocido el papel que juegan las ASC en el desarrollo de la patología cardiovascular, y el impacto que los factores de riesgo tienen sobre su funcionalidad.

En esta tesis hemos analizado las propiedades fenotípicas y funcionales de las ASC de distintas localizaciones adiposas en un modelo animal con acumulación de factores de riesgo. Hemos detectado diferencias intrínsecas de las ASC residentes en los distintos depósitos de grasa, relacionadas con su potencial de diferenciación, que se ven incrementadas en una situación patológica. Estas diferencias en las ASC ayudan a explicar la menor capacidad de expansión del tejido adiposo visceral y su consecuente mayor riesgo metabólico. Por otro lado, hemos demostrado que la presencia de factores de riesgo cardiovascular tiene un impacto negativo en las propiedades angiogénicas de las ASC subcutáneas y epicárdicas. Esta disminución de la capacidad para estimular la formación de vasos limita el uso autólogo de estas células para tratar enfermedades de carácter isquémico, pero también podría ser una de las causas de los problemas vasculares asociados a importantes factores de riesgo cardiovascular. Hemos identificado la vía de señalización Notch, en todos los casos, como un mecanismo clave en la regulación del potencial de diferenciación de las ASC, mediante el cual las modificaciones patológicas producidas por la acumulación de factores de riesgo cardiovascular, tienen un impacto sobre la funcionalidad de las ASC de las distintas localizaciones adiposas. Adicionalmente, hemos observado que el trasplante de médula ósea de donantes con factores de riesgo cardiovascular incrementa el fenotipo pro-

aterogénico en receptores sanos, lo que podría explicar el elevado riesgo cardiovascular de pacientes sometidos a este procedimiento. Finalmente, en esta tesis se han descrito por primera vez las características fenotípicas y funcionales de las ASC derivadas de tejido adiposo perivascular coronario humano. Se ha observado una comunicación activa entre las ASC y las células musculares lisas, en un proceso mediado por la expresión de Tissue factor (TF) en las ASC. Este hallazgo, junto con la observación de altos niveles de expresión de TF en las ASC de pacientes con una elevada acumulación de factores de riesgo cardiovascular, abre un nuevo enfoque en la investigación sobre los procesos angiogénicos que se desarrollan en torno a la placa aterosclerótica en las arterias coronarias. Por tanto, los resultados de esta tesis demuestran que los factores de riesgo cardiovascular regulan las propiedades funcionales de las ASC de distintas localizaciones adiposas, y que dicho efecto está mediado en parte por la alteración de la vía de señalización Notch. El efecto de los factores de riesgo cardiovascular sobre las ASC reduce el potencial de las mismas para la reparación espontánea de tejidos dañados y para su posible uso en terapia celular autóloga.

INTRODUCCIÓN

1. LAS ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES

Las enfermedades cardiovasculares son un conjunto heterogéneo de trastornos que pueden afectar a los vasos sanguíneos y/o al corazón. Éstas incluyen la cardiopatía isquémica coronaria (también conocida como enfermedad arterial coronaria), el ictus, el aneurisma aórtico, las arteriopatías periféricas, las cardiopatías congénitas, y la trombosis venosa profunda entre otras.

1.1 Epidemiología de las enfermedades cardiovasculares

Actualmente las enfermedades cardiovasculares constituyen la primera causa de muerte entre la población mundial según datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS)[1]. Se calcula que en 2012 murieron por esta causa 17,5 millones de personas, lo cual representa un 31% de todas las muertes registradas en el mundo. Los últimos datos publicados por el Instituto Nacional de Estadística muestran una tendencia muy similar a nivel del territorio español, donde las enfermedades cardiovasculares causaron un total de 234.786 defunciones en 2014, un 30% del total (Figura 1).

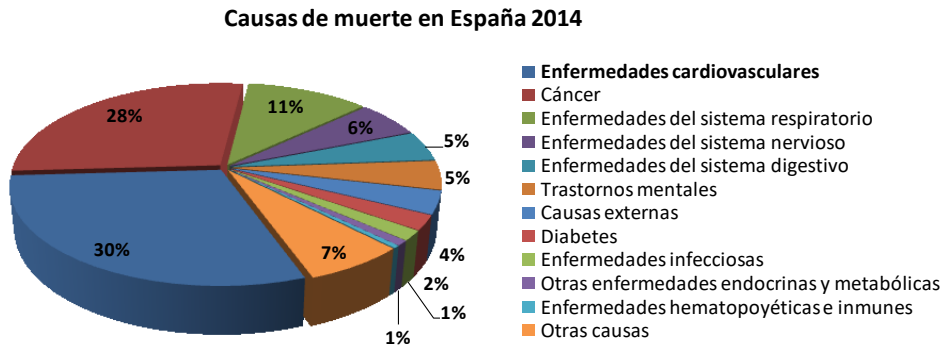


Figura 1. Causas de muerte en España durante el año 2014. Gráfico elaborado a partir de los datos publicados por el Instituto Nacional de Estadística (INE)[2]

Entre las enfermedades cardiovasculares, la enfermedad cardíaca isquémica (causada principalmente por la obstrucción de las arterias coronarias) es la que provoca el mayor número de muertes entre hombres y mujeres, pero también representa la disparidad más grande en el tipo de enfermedad cardíaca entre los sexos. A pesar de los esfuerzos dedicados a la investigación y la prevención

clínica, se prevé que el número de muertes por esta causa seguirá en aumento, por lo menos hasta 2030[3].

1.2 Aterosclerosis

La aterosclerosis es una patología compleja de la pared vascular, caracterizada por la deposición de lípidos y otros componentes sanguíneos dentro de la pared arterial, cuyo engrosamiento puede provocar estenosis o trombosis causando eventos isquémicos distales. Se trata de un proceso inflamatorio crónico que comienza a desarrollarse en edades tempranas de forma asintomática y avanza gradualmente durante la edad adulta. Sus principales manifestaciones clínicas son la cardiopatía isquémica, el accidente cerebrovascular y la arteriopatía periférica, que se presentan en etapas avanzadas de la enfermedad como consecuencia de la erosión o la ruptura de las lesiones ateroscleróticas[4,5]. La composición de la placa aterosclerótica, más que su tamaño (grado de estenosis), se considera como el mayor determinante del desarrollo de estos síndromes agudos mediados por trombosis. De hecho, observaciones clínicas y patológicas indican que las placas con alto contenido en lípidos son más vulnerables y trombogénicas que las placas ricas en colágeno, las cuales han demostrado ser más estables[6].

1.2.1 Estructura de la pared arterial

El sistema vascular está formado por arterias, venas, arteriolas, vénulas y capilares que difieren entre sí por su dimensión, morfología y función. La pared vascular es un órgano activo y flexible capaz de adaptarse y reorganizarse en respuesta a estímulos fisiológicos o patológicos y está compuesta por tres capas concéntricas (Figura 2):

- Íntima: Es la capa interna del vaso y está formada por una monocapa de células endoteliales orientadas longitudinalmente en la dirección del flujo sanguíneo (endotelio) y una matriz compuesta básicamente por proteoglicanos y colágeno (subendotelio).

- Media: Está formada por células musculares lisas (VSMC, del inglés *vascular smooth muscle cells*), encargadas de mantener el tono vascular, dispuestas de forma circular o helicoidal con respecto al eje del vaso y por matriz extracelular formada fundamentalmente por colágeno y elastina. Esta capa

está separada de la íntima por la lámina elástica interna y exteriormente por la lámina elástica externa.

- Adventicia: Es la capa externa y su grosor depende tanto del tipo de vaso como de su localización. Está formada por tejido conjuntivo, fibroblastos, fibras elásticas y fibras de colágeno y por ella discurre una red de vasos de muy pequeño calibre llamada *vasa vasorum*, que penetra ocasionalmente en la media para aportar nutrientes a las VSMC que la componen. Además, esta capa aporta estabilidad a la pared vascular conectando el vaso con los tejidos circundantes y parece estar relacionada con el metabolismo de la pared vascular[7].

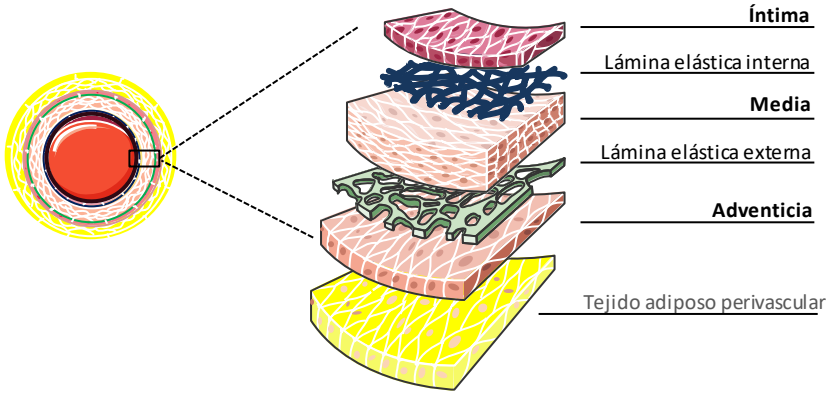


Figura 2. Estructura de la pared arterial. Del interior hacia el exterior del vaso encontramos la capa (o túnica) íntima, lámina elástica interna, capa media, lámina elástica media y capa adventicia. La mayoría de arterias están rodeadas por una capa de grasa o tejido adiposo perivascular.

1.2.2 Desarrollo de la lesión aterosclerótica

Las lesiones ateroscleróticas afectan prácticamente a todos los territorios arteriales vasculares, desarrollándose principalmente en las arterias de mediano (coronarias) y gran calibre (aorta, carótida e iliofemoral)[7,8], en aquellas zonas donde se observan perturbaciones del flujo sanguíneo y donde las células endoteliales que componen la íntima son sometidas a esfuerzos de cizalla como ocurre en las curvaturas, las ramificaciones y las bifurcaciones[4,8,9].

Las causas y procesos mediante los cuales se desarrollan las lesiones ateroscleróticas aún no han sido determinados. Actualmente, se considera que

el evento que desencadena la formación de la lesión aterosclerótica es un daño a nivel endotelial provocado tanto por factores locales (hemodinámicos) como sistémicos (factores de riesgo cardiovascular como hipercolesterolemia, hipertensión, tabaquismo, etc.). Como consecuencia se induce una disfunción del endotelio, que conlleva un aumento en la permeabilidad de la capa endotelial y una elevada adhesión de leucocitos (mayoritariamente monocitos y linfocitos T), mediada por integrinas y selectinas que quedan expuestas en la superficie de las células endoteliales activadas[10] (Figura 3).

Los leucocitos adheridos al endotelio transmigran al espacio subendotelial, donde se diferencian en macrófagos y captan una cantidad elevada de moléculas de colesterol y ésteres de colesterol, provenientes de lipoproteínas de baja densidad (LDL) que han difundido por el endotelio disfuncional, y se transforman en células espumosas, uno de los componentes celulares característicos en la lesión aterosclerótica[11]. La activación de macrófagos y linfocitos T por los estímulos inflamatorios continuos desencadena la liberación de enzimas hidrolíticas, citoquinas y factores de crecimiento que pueden lesionar el endotelio adyacente y provocar áreas focalmente denudadas, encontrándose a menudo plaquetas adheridas al tejido subendotelial expuesto sobre las placas maduras[12]. A su vez, plaquetas y microtrombos contribuyen al crecimiento de la placa mediante la estimulación de células adyacentes del interior de la placa y/o su incorporación a la lesión.

Las células endoteliales activadas, las plaquetas y los macrófagos, liberan factores de crecimiento como el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) y el factor de crecimiento transformante β (TGF-β) que poseen propiedades quimiotácticas y mitogénicas, por lo que probablemente son decisivos para la evolución de la placa. De este modo, la liberación de citoquinas y factores de crecimiento induce una transformación de las VSMC de la capa media adquiriendo un fenotipo "sintético", confiriéndoles una mayor actividad funcional (capacidad de migrar, dividirse y sintetizar proteínas de la matriz extracelular como colágeno, proteoglucanos y elastina) y provocando su migración hacia la capa íntima y la subsiguiente proliferación[13]. Todo esto conlleva a un mayor engrosamiento de la íntima y a una reducción de la luz arterial (flujo sanguíneo), lo que deriva en sintomatología de angina estable. Las VSMC con fenotipo sintético invaden la lesión y forman la capa fibrosa de la

placa aterosclerótica. Además, estas VSMC captan a su vez LDL modificadas y se transforman también en células espumosas (Figura 3).

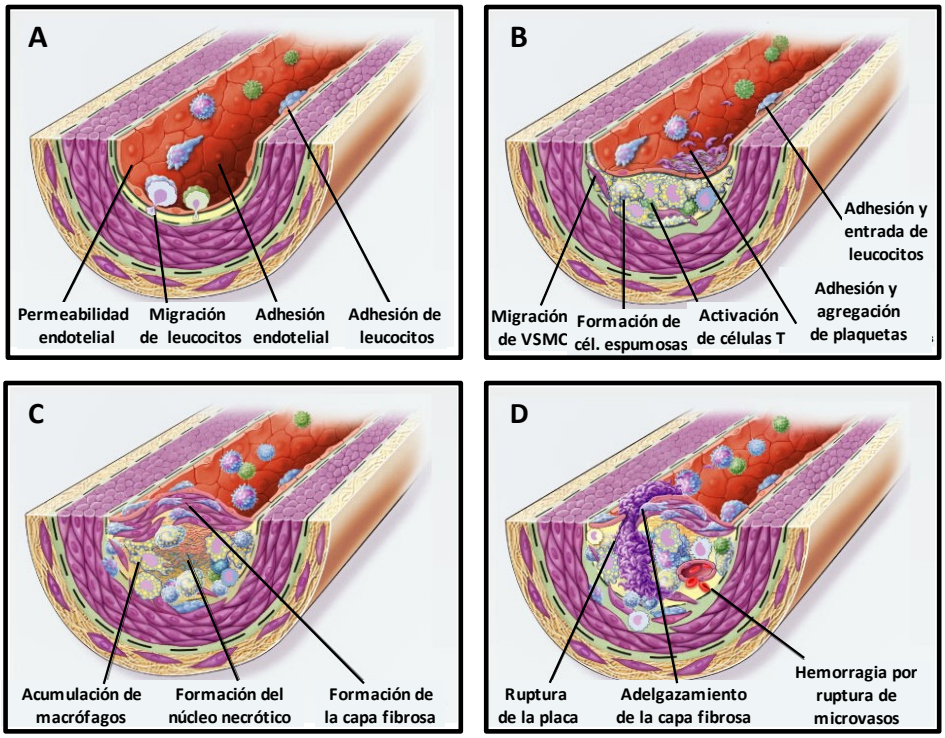


Figura 3. Desarrollo de la placa aterosclerótica. A) La disfunción endotelial provoca un aumento de la permeabilidad favoreciendo la entrada de LDL y aumentando la expresión de moléculas de adhesión que favorecen la fijación de leucocitos al endotelio. **B)** Las LDL internalizadas sufren modificaciones que favorecen el reclutamiento de más células inflamatorias, la diferenciación de monocitos a macrófagos y la internalización de grandes cantidades de lípidos por los macrófagos, dando lugar a células espumosas. El daño endotelial persistente provoca la acumulación de plaquetas que junto con las células inflamatorias y endoteliales, secretan factores de crecimiento que estimulan la migración y proliferación de las células musculares lisas (VSMC). **C)** La proliferación y migración de VSMC contribuye a la formación de la capa fibrosa. Las células espumosas, sobresaturadas de grasa, mueren liberando depósitos lipídicos que inducen la formación del núcleo necrótico. **D)** La ruptura de la capa fibrosa puede dar lugar rápidamente a la trombosis, y normalmente ocurre en las zonas de lesión avanzada donde esta capa se ha hecho más fina. La secreción de factores angiogénicos por las células endoteliales, musculares e inflamatorias conduce a la formación de microvasos que favorecen la inflamación en la placa, incrementando el tamaño de la lesión. Las enzimas proteolíticas secretadas por células endoteliales adelgazan la cubierta fibrosa, favoreciendo su ruptura. Así, se facilita la aparición de hemorragias intraplaca y la exposición del contenido trombogénico al lumen de la arteria, dando lugar a isquemia o necrosis. Figura adaptada de Ross R., 1999 [11].

La presencia de factores angiogénicos secretados por las células de la placa favorece a su vez la neogénesis de microvasos en su interior. Aunque la regulación de este proceso es todavía poco conocido, se ha descrito que estos microvasos contribuyen al crecimiento e inestabilidad de la placa aterosclerótica. Por un lado, favorecen la llegada de células inflamatorias, y por otro lado, la ruptura de pequeños vasos inestables puede dar lugar a hemorragias internas, que constituyen un estímulo para el avance de la enfermedad a la vez que confieren mayor vulnerabilidad de la placa aterosclerótica a la rotura[14].

Las principales complicaciones de la aterosclerosis son aquellas derivadas de la formación de un trombo oclusivo, lo cual puede ocurrir como consecuencia de la ruptura o erosión de la placa. El riesgo de ruptura de la placa aterosclerótica depende principalmente de su composición y vulnerabilidad más que del grado de estenosis que provoca. Así, las lesiones estables son aquellas que presentan un bajo contenido de lípidos y cubiertas fibrosas gruesas y uniformes que las hacen resistentes a la ruptura En cambio, las placas más vulnerables a la ruptura son aquellas que tienen cubiertas fibrosas finas, con un número elevado de células inflamatorias y un núcleo excéntrico rico en lípidos.

1.3 Angiogenesis en la enfermedad cardiovascular

La vasculogénesis y la angiogenesis son los procesos responsables del desarrollo del sistema circulatorio, la primera unidad funcional del embrión en desarrollo. La vasculogénesis requiere el reclutamiento de células madre/progenitoras endoteliales, mientras que la angiogénesis es un proceso mediante el cual se generan nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes, y que involucra una gran variedad de factores de crecimiento, así como la participación de varios tipos celulares. La formación de nuevo endotelio se da tanto por la migración y proliferación de las células endoteliales adyacentes, como de células circulantes progenitoras que pueden haber sido movilizadas desde la médula ósea, o bien ser residentes en el tejido vascular. A medida que la vasculatura madura, los cambios en el flujo sanguíneo, la demanda metabólica, y la secreción de factores de crecimiento inducen el remodelado vascular y un rediseño de la red de vasos sanguíneos. Durante la formación de un vaso se inicia la secreción de matriz extracelular por las células endoteliales y las células estromales a su alrededor, seguida por el reclutamiento de pericitos y VSMC para aportar estabilidad[15].

En el adulto, la angiogénesis ocurre durante el crecimiento esquelético, el ciclo menstrual y el embarazo, pero también está involucrada en la curación de heridas y la reparación del daño tisular por isquemia, donde la revascularización puede mejorar el flujo sanguíneo en zonas donde éste se ha visto comprometido por la oclusión parcial o total de una o varias arterias. En estos casos, se desarrollan vasos sanguíneos colaterales que irrigan los tejidos isquémicos, de forma endógena o en respuesta a la administración de factores de crecimiento. Se trata por tanto de un proceso de vital importancia para la formación del sistema vascular y la reparación tisular. Por ese motivo, la terapia angiogénica es una de las más prometedoras en el tratamiento de las enfermedades cardiovasculares y, en especial, de las enfermedades isquémicas coronarias como el infarto de miocardio.

Sin embargo, a pesar de la importancia de la formación de nuevos vasos, un desequilibrio en los procesos angiogénicos puede contribuir también al desarrollo o complicación de una patología. Son conocidos los efectos deletéreos de la angiogénesis en la retinopatía diabética, la artritis, y más notablemente en el crecimiento de tumores y la metástasis. La angiogénesis patológica y la fisiológica comparten la mayoría de procesos y características, en ambas situaciones, una cascada de funciones celulares altamente coordinadas dirige la formación de nuevos vasos sanguíneos en respuesta a una demanda creciente de oxígeno y nutrientes. La principal diferencia entre estos dos procesos es que la angiogénesis patológica no suele alcanzar una correcta resolución en el establecimiento de una perfusión vascular, creando vasos inestables y hemorrágicos[16]. Esto tiene consecuencias especialmente nocivas en el interior y alrededores de la placa aterosclerótica. Investigaciones recientes apuntan a que una elevada densidad de nuevos capilares sanguíneos en el interior de la placa y la inflamación en la íntima de la pared vascular están asociadas al desarrollo de placas inestables en las lesiones arteriales, a hemorragias internas y a un elevado número de episodios trombóticos[17–19].

Por lo tanto, la angiogénesis participa de forma beneficiosa en la reparación endógena de órganos afectados por eventos cardiovasculares, pero también puede participar del desarrollo de la enfermedad cardiovascular, particularmente en el avance y la complicación de las lesiones ateroscleróticas.

2. FACTORES DE RIESGO CARDIOVASCULAR

Las enfermedades cardiovasculares se consideran enfermedades multifactoriales, dinámicas y progresivas que se desarrollan como consecuencia de la interacción entre factores genéticos y ambientales. Grandes estudios prospectivos de cohorte, como el Framingham Heart Study, han detectado una serie de condiciones que favorecen la aparición de eventos cardiovasculares[20] y que permiten estratificar a los pacientes estimando su probabilidad de desarrollar enfermedad cardiovascular dentro de un tiempo determinado. Esta serie de condiciones son conocidas como factores de riesgo cardiovascular (FRCV). La detección de FRCV en los pacientes se ha convertido en una herramienta clínica fundamental ya que, por un lado, la modificación de estos puede evitar o retrasar el desarrollo de la patología, y por otro lado, la estimación del riesgo global de cada paciente permite adecuar las medidas preventivas.

Tradicionalmente los factores de riesgo se han clasificado en dos grupos en función de la capacidad que tenemos para actuar sobre ellos:

Factores de riesgo no modificables

Edad: La enfermedad cardiovascular aumenta en la población a medida que esta envejece. Según datos de la OMS, aproximadamente el 82% de las muertes por enfermedad coronaria ocurren en pacientes mayores de 65 años y el riesgo de padecer un ictus se duplica con cada década a partir de los 55 años[1].

Historia familiar: La existencia de antecedentes familiares de enfermedad cardiovascular incrementa el riesgo de padecerla[21]. De hecho, el riesgo de sufrir un infarto de miocardio aumenta cuando un pariente de primer grado ha padecido uno antes de los 55 años, en el caso de hombres, o 65 en el caso de las mujeres. Si ambos padres han padecido enfermedad cardiovascular antes de los 55 años, el riesgo se incrementa un 50% con respecto a la población general. Además se ha detectado un componente genético en diversos factores de riesgo como la hipertensión, la hipercolesterolemia y la diabetes[22].

Sexo: Los hombres tienen un riesgo más elevado de padecer enfermedad coronaria que las mujeres (premenopáusicas). La menor incidencia de

enfermedad cardiovascular isquémica en mujeres premenopáusicas en comparación con los hombres de la misma edad y el aumento de las enfermedades cardiovasculares asociadas a la menopausia han sugerido que las hormonas ováricas subyacen a un efecto protector sobre el sistema cardiovascular para las mujeres. De hecho, las hormonas esteroides sexuales ejercen múltiples efectos directos e indirectos sobre la fisiología cardiovascular[23]. Sin embargo, el riesgo de evento cerebrovascular es similar en hombres y mujeres[24,25].

Factores de riesgo modificables

Consumo de tabaco: Es la principal causa evitable de morbilidad y mortalidad por enfermedad isquémica coronaria[26] y estudios clínicos y datos de autopsias lo han asociado con una progresión rápida de la enfermedad, demostrando además que está directamente asociado con el grado de severidad de la misma. Los mecanismos por los cuales el consumo de tabaco promueve el desarrollo de la enfermedad cardiovascular son diversos: produce disfunción endotelial, aumenta los depósitos de lípidos en la pared vascular, incrementa la coagulación, aumenta el colesterol LDL y reduce el colesterol HDL[27]. Además, la nicotina incrementa la frecuencia cardiaca y aumenta la presión arterial.

Consumo excesivo de alcohol: El abuso en el consumo de alcohol puede elevar la presión arterial, provocar insuficiencia cardiaca y desembocar en el desarrollo de accidentes cerebrovasculares. Además, puede contribuir a incrementar los niveles de triglicéridos así como al desarrollo de obesidad[28,29].

Diabetes: La diabetes, enfermedad más detallada en el apartado 3, deriva en múltiples complicaciones, la mayoría de las cuales implican daño vascular, afectando desde la microvasculatura hasta las arterias[30]. La hiperglucemia persistente combinada con la resistencia a insulina y la presencia de otros factores de riesgo metabólicos incrementan el riesgo absoluto de sufrir eventos coronarios en pacientes diabéticos, igualándolo al de pacientes no diabéticos con enfermedad coronaria establecida[31]. Además, la presencia de diabetes puede provocar un síndrome llamado miocardiopatía diabética, con disfunción ventricular e insuficiencia cardíaca, independiente de la enfermedad coronaria subyaciente[32].

Dislipemia: La dislipemia engloba una serie de condiciones patológicas que alteran el metabolismo de los lípidos y a consecuencia de ello, también las concentraciones plasmáticas de colesterol y/o triglicéridos. En general, se habla de hipercolesterolemia cuando la concentración de colesterol en plasma es > 240 mg/dl y de hipertrigliceridemia cuando la concentración de triglicéridos es > 200 mg/dl. Sin embargo, el riesgo cardiovascular empieza a aumentar en valores inferiores, por lo que se consideran concentraciones deseables para la población general < 200 mg/dl para el colesterol y < 150 mg/dl para los triglicéridos[33]. Estudios epidemiológicos prospectivos han demostrado que los niveles de colesterol unido a LDL en sangre están estrechamente asociados al desarrollo de enfermedad cardiovascular aterosclerótica[34]. Es por ello que la reducción del colesterol LDL mediante el tratamiento con estatinas es frecuente en prevención primaria. Sin embargo, este enfoque puede ser insuficiente en pacientes con otras anormalidades lipídicas, incluyendo niveles elevados de triglicéridos o bajos niveles de colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad (HDL), los cuales se asocian también de forma independiente con el riesgo cardiovascular[35].

Hipertensión: La tensión arterial normal en adultos es de aproximadamente 120mm Hg (tensión sistólica) y 80mm Hg (tensión diastólica). Se considera hipertensión cuando la tensión sistólica es igual o superior a 140mm Hg y/o la tensión diastólica es igual o superior a 90mm Hg[36]. La hipertensión aumenta el riesgo de múltiples enfermedades cardiovasculares[37], incluyendo accidentes cerebrovasculares, enfermedad de las arterias coronarias, insuficiencia cardiaca, fibrilación auricular[38], y la enfermedad vascular periférica. La enfermedad coronaria en hombres y el accidente cerebrovascular en mujeres son principalmente los primeros eventos cardiovasculares observados después de la aparición de la hipertensión, tal y como se observa en datos de Framingham Heart Study[39].

Obesidad: La obesidad ha aumentado en proporciones epidémicas tanto en adultos como en niños en los últimos años[40]. En los adultos, el sobrepeso se define como un índice de masa corporal (IMC) de 25 a 29,9 kg/m^2, y la obesidad como IMC ≥30 kg/m^2. La presencia de obesidad contribuye a elevar la presión arterial, altera los niveles lipídicos y favorece un estado pro-inflamatorio y el desarrollo de resistencia a la insulina, incrementando así el riesgo de

desarrollar diabetes y consecuentemente el de desarrollar enfermedad cardiovascular [41].

Sedentarismo: Existen grandes evidencias que apoyan la idea de que la actividad física produce una serie de importantes beneficios para la salud. La actividad física regular se asocia con una reducción en la mortalidad general y en las enfermedades cardiovasculares (entre ellas la enfermedad coronaria)[42]. También se asocia con una reducción en la incidencia de la obesidad y la diabetes mellitus tipo 2, y una mejora en el control metabólico de las personas con diabetes tipo 2. También se reconoce el impacto favorable de la actividad física sobre otros factores de riesgo cardiovascular, incluyendo una reducción de la presión arterial, mejora en el perfil de lípidos en plasma, y alteraciones en factores hemostáticos y de la coagulación[43].

Factores psicosociales y psiquiátricos: la exposición al estrés crónico (o sobrecarga alostática) conduce a respuestas de mala adaptación en varios órganos del cuerpo y activa mecanismos fisiopatológicos como las enfermedades cardiovasculares[44].

2.1 Acumulación de factores de riesgo cardiovascular

Habitualmente, los factores de riesgo cardiovascular no aparecen de manera individual, sino que los pacientes tienden a presentar una acumulación de estos. Esto es debido a que por un lado, un estilo de vida poco saludable suele estar asociado simultáneamente a varios factores como el sedentarismo, las dietas ricas en grasas o el consumo de alcohol y tabaco. Por otro lado, patologías como la diabetes están fuertemente asociadas con un patrón de factores de riesgo cardiovascular. De hecho, sólo una pequeña parte del riesgo tan aumentado de aparición de enfermedad aterosclerótica en individuos con diabetes tipo 2 se explica por los efectos de la diabetes por sí sola. Por tanto, otros factores están implicados en la aceleración de la aterosclerosis en estos pacientes, y estos incluyen la hipertensión, la hiperglucemia, la obesidad visceral, alteraciones en la composición y metabolismo de las lipoproteínas y altos niveles de insulina plasmática y/o resistencia a isulina[45].

La observación de este fenómeno y su importancia clínica dio lugar hace décadas a la definición del actualmente llamado síndrome metabólico, que más que una enfermedad en sí misma, consiste en un conjunto de alteraciones

metabólicas constituido por la obesidad de distribución central (visceral), tolerancia anormal a la glucosa o diabetes, la hipertensión, y la dislipemia con una disminución de las concentraciones de colesterol HDL y altas concentraciones de triglicéridos[46]. Estos factores de riesgo contribuyen de manera individual al riesgo cardiovascular, pero su asociación lo incrementa más que de forma meramente aditiva. Las personas con síndrome metabólico tienen dos veces más riesgo de sufrir una enfermedad cardiovascular.

Ya sea cumpliendo o no los criterios diagnósticos para considerar la presencia de síndrome metabólico, múltiples estudios (*The Multiple Risk Factor Intervention Trial*[47], el *WHO-ERICA Project*[48] y el *Framingham Study*[49]) han demostrado la importancia clínica de la acumulación de FRCV y su repercusión en el estado metabólico, inflamatorio y trombótico del paciente.

2.2 Estimación y prevención del riesgo cardiovascular

Se estima que más del 80% de los casos de enfermedad arterial coronaria podrían evitarse si la población siguiera unas guías básicas de hábitos saludables como ejercicio físico regular, control del peso, dieta saludable, no fumar y realizar un consumo moderado de alcohol[50]. Sin embargo, la realidad es que la prevención de esta enfermedad no es sencilla y requiere intervención a múltiples niveles, incluyendo la identificación y el tratamiento de los FRCV (prevención primaria), diagnóstico temprano y tratamiento óptimo (prevención secundaria) y limitación de la progresión de la enfermedad establecida (prevención terciaria).

Las actuales recomendaciones de prevención enfatizan la necesidad de valorar el riesgo multifactorial para ofrecer un consejo preventivo integrado a los individuos. Como se ha mencionado antes, la estimación del riesgo cardiovascular o de enfermedad coronaria de una persona es un instrumento esencial para tomar decisiones clínicas sobre las intervenciones necesarias para controlar los factores de riesgo. Aunque existen distintos métodos, en España, el Comité Español para la Prevención Cardiovascular y la Sociedad Española de Cardiología recomiendan el uso de la Systematic Coronary Risk Evaluation (SCORE)[51] siguiendo las recomendaciones actuales de las guías clínicas europeas para la prevención de la enfermedad cardiovascular[52].

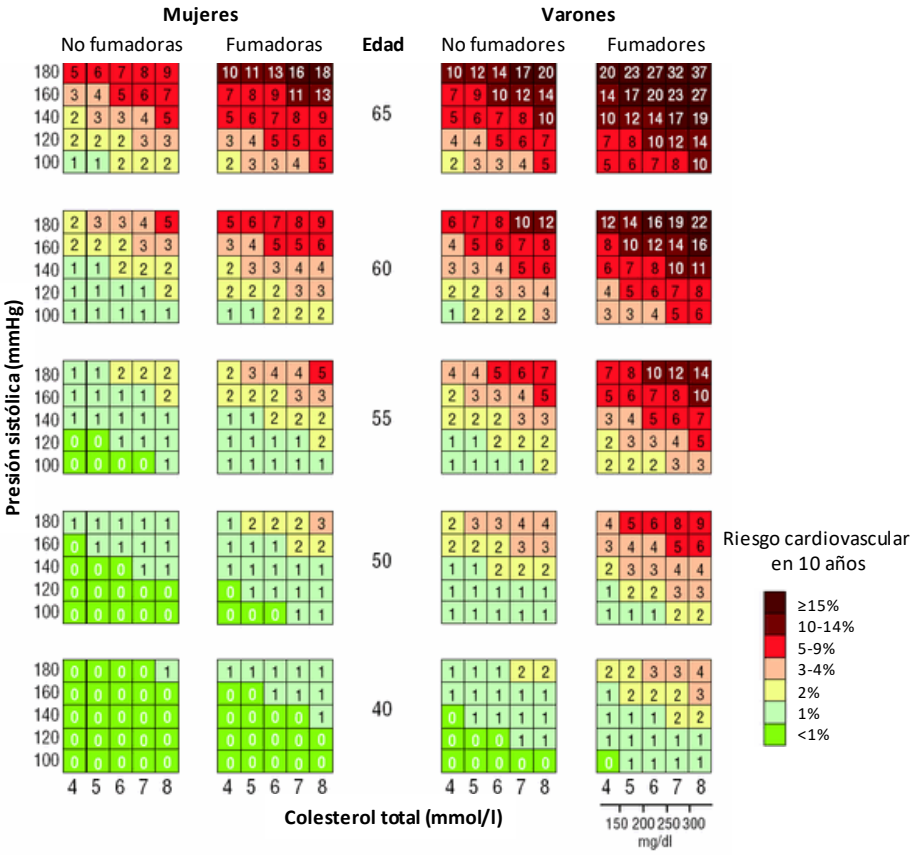


Figura 4. Tabla SCORE del riesgo estimado de mortalidad cardiovascular aterosclerótica en 10 años calibrada para España, para valores específicos de presión arterial sistólica y colesterol total, según hábito tabáquico, sexo y edad. Figura adaptada de Sans S. y colaboradores, 2007 [53].

Este modelo estima el riesgo de muerte ocasionada por enfermedad cardiovascular a 10 años, según la edad, el sexo, la presión arterial sistólica, el colesterol total en suero y el tabaquismo actual. La característica más importante de la función de riesgo SCORE comparada con la de Framingham[20] es que estima el riesgo mortal de todas las manifestaciones aterotrombóticas cardiovasculares, incluidos el ictus, la insuficiencia cardiaca, la insuficiencia arterial periférica o ciertos aneurismas y no sólo la enfermedad coronaria. La lógica de este cambio es que los mismos factores de riesgo están asociados con diversas enfermedades y que las personas con alto riesgo de muerte cardiovascular también lo están de episodios no mortales. En el proceso de adaptación de las guías de prevención, se aconsejó calibrar los modelos SCORE al nivel de riesgo de cada país (Figura 4).

En las últimas guías europeas de prevención cardiovascular en la práctica clínica (2016), se enfatiza el cálculo del riesgo mediante la ecuación SCORE en personas sanas, y los protocolos de actuación apuntan a la reducción de niveles en tres factores de riesgo poblacional: la reducción del colesterol, de la presión arterial y del tabaquismo, con el uso de estatinas y fármacos anti-hipertensivos como medidas coste-efectivas en pacientes con elevado riesgo cardiovascular[52].

2.3 Trasplante de médula ósea y riesgo cardiovascular asociado

El trasplante de médula ósea o de células madre hematopoyéticas, es un procedimiento habitual en el tratamiento de diversas neoplasias hematológicas. Consiste en la administración de quimioterapia mielosupresora seguida de la infusión de células madre progenitoras que reemplazan las células malignas. La médula ósea inyectada puede proceder de un donante (trasplante alogénico), o bien del propio paciente (trasplante autogénico o autólogo). Según el Registro Europeo de Trasplantes de Células Madre Hematopoyéticas, en 2012 un 42% de todos los trasplantes realizados fueron alogénicos[54].

El trasplante de médula ósea tiene varias complicaciones asociadas, siendo la enfermedad cardiovascular la más común entre ellas. Aquellos individuos que sobreviven a los primeros 100 días después del trasplante, mantienen un elevado riesgo cardiovascular durante muchos años después del procedimiento, que es cuatro veces superior al de la población general[55,56]. Además, tienen un mayor riesgo de desarrollar síndrome metabólico[57] y desarrollan más FRCV *de novo* tras el trasplante[58]. Se ha descrito que en estos pacientes, la incidencia acumulada a 10 años de la intervención es del 37.7% en hipertensión, 18.1% en diabetes, 46.7% en hiperlipemia, y 31.4% en desarrollar más de un FRCV. En el caso de los eventos cardiovasculares, la incidencia acumulada a 10 años es significativamente superior en aquellos pacientes que presentan uno o más FRCV (Figura 5)[59].

Se ha propuesto que los receptores de un trasplante de médula ósea podrían tener un riesgo tan elevado de desarrollar enfermedad cardiovascular debido a los tratamientos previos al trasplante, así como a la enfermedad injerto contra huésped[58,60,61]. Sin embargo, todavía no se han descrito los mecanismos que asocien estos mecanismos con el elevado riesgo cardiovascular observado.

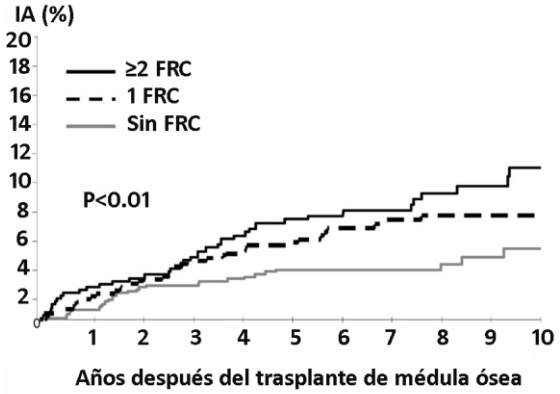


Figura 5. Incidencia acumulada de eventos cardiovasculares después de un trasplante de médula ósea en función del número de factores de riesgo cardiovascular de los pacientes. FRCV: factores de riesgo cardiovascular; IA: incidencia acumulada. Figura adaptada de Armenian S.H, 2012 [59].

3. DIABETES

3.1 Prevalencia de la diabetes

La diabetes es una enfermedad metabólica crónica caracterizada por la presencia de niveles aumentados de glucosa en sangre. Los cambios que la población está experimentado en cuanto al estilo de vida en las últimas décadas, particularmente la falta de ejercicio físico y la proliferación de dietas ricas en grasas, han contribuido a incrementar dramáticamente su prevalencia a nivel mundial (Figura 6).

Actualmente, el número de personas con diabetes sigue aumentando rápidamente en muchos países, y de manera extraordinaria en los países de ingresos bajos y medianos. De este modo, según estimaciones de la Federación Internacional de Diabetes (IDF), en el año 2015, 415 millones de personas (8.8% de la población adulta) padecían esta enfermedad a nivel mundial y, de mantenerse la tendencia actual, se estima que en el año 2040 dicha cifra alcanzará los 642 millones de personas (10.4% de la población adulta)[62] (Tabla 1).

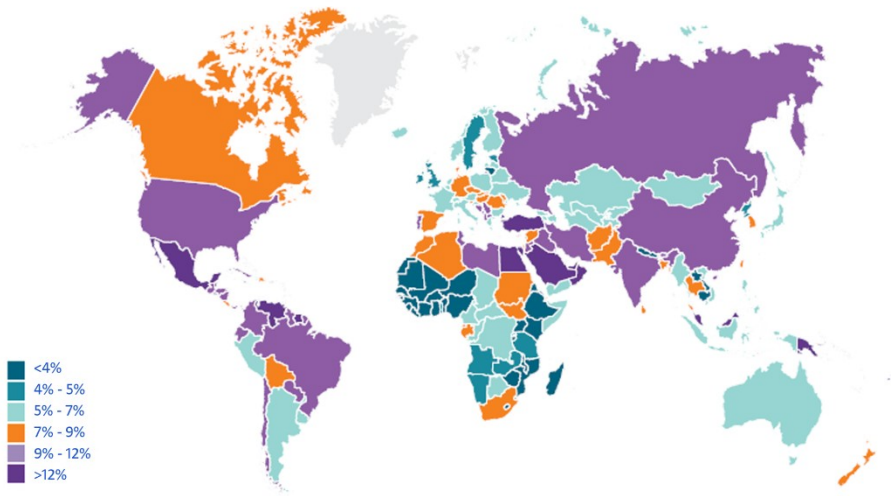


Figura 6. Mapa mundial de la estimación de prevalencia ajustada por edad de diabetes en adultos (20-79 años) en 2015 de la Federación Internacional de Diabetes [62].

	2015	2040
Población mundial	7.3 billones	9.0 billones
Población adulta (20-79 años)	4.72 billones	6.16 billones
Población infantil (0-14 años)	1.92 billones	-
Diabetes (20-79 años)		
Prevalencia global	8.8% (7.2-11.4%)	10.4% (8.5-13.5%)
Personas con diabetes	415 millones (340-536M)	642 millones (521-829M)
Intolerancia a la glucosa (20-79 años)		
Prevalencia global	6.7% (4.5-12.15)	7.8% (5.2-13.9%)
Personas con intolerancia a la glucosa	318 millones (212.2-571.6M)	481 millones (317.1-855.7M)

Tabla 1. Estimaciones de la Federación Internacional de Diabetes para los años 2015 y 2040 a nivel mundial [62].

La situación en Europa es representativa de lo que ocurre a nivel mundial, pues mientras en el año 2015 la prevalencia de diabetes era de un 9.1%, se estima que para el 2040 ésta aumentará hasta un 10.7%. Sin embargo, en España la situación resulta todavía más preocupante. Aunque no existen predicciones concretas a nivel nacional para el 2040, mientras el año 2011 la prevalencia de diabetes era similar a la media europea (8.1%) y afectaba a 2.8 millones de personas, en el 2015 esta cifra ascendió a un 10.4% (3.5 millones de personas) (Figura 7).

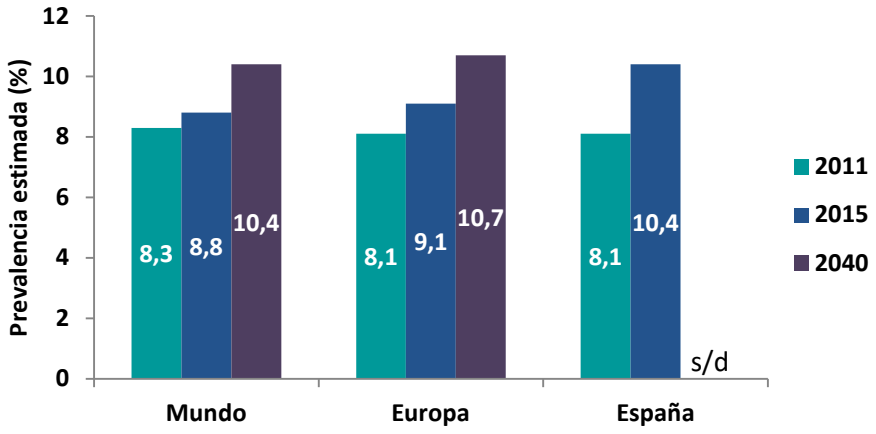


Figura 7. Estimación de prevalencia de diabetes para los años 2011, 2015 y 2040, elaborados a partir de datos de la Federación Internacional de Diabetes [62,63]. (s/d: sin datos disponibles).

3.2 Clasificación

La OMS[64] define la diabetes mellitus como una alteración metabólica con etiologías diversas caracterizada por la presencia de hiperglucemia crónica, y establece que existen dos formas principales de esta enfermedad: diabetes tipo 1 y diabetes tipo 2. Sin embargo, también reconoce la existencia de otras formas de diabetes (gestacional, genéticas, etc.) y define dos estados intermedios de hiperglucemia, la tolerancia anormal a la glucosa (IGT, del inglés *impaired glucose tolerance*) y la glucemia de ayuno anormal (IFG, del inglés *impaired fasting glucose*), que representan etapas previas al desarrollo de la diabetes. Los criterios de diagnóstico establecidos por la OMS[65] se detallan en la Tabla 2.

Diagnóstico	Glucemia en ayunas	Glucemia 2horas después de ingerir 75g de glucosa
Glucemia de ayuno anormal (IFG)	6.1mmol/L (110mg/dL) - 6.9mmol/L (125mg/dL)	-
Tolerancia anormal a la glucosa (IGT)	<7mmol/l (126mg/dl)	≥7.8mmol/l (140mg/dl) y <11.1mmol/l (200mg/dl)
Diabetes	≥7mmol/l (126mg/dl)	≥11.1mmol/l (200mg/dl)

Tabla 2. Criterios de diagnóstico para la diabetes, IGT e IFG definidos por la OMS[65].

3.2.1 Diabetes tipo 1

La diabetes tipo 1 se desarrolla normalmente durante la infancia y la adolescencia (aunque también puede ocurrir en la edad adulta) y se caracteriza por una ausencia absoluta de insulina debida a una destrucción selectiva de las células β en los islotes pancreáticos de Langerhans. La muerte de las células productoras de insulina se produce a causa de una reacción inmune en pacientes con predisposición genética y con una regulación inmunológica insuficiente. Este proceso involucra múltiples componentes de tanto los sistemas de inmunidad innata como los de la adaptativa. Los islotes pancreáticos inflamados en pacientes con diabetes tipo 1 son predominantemente infiltrados por linfocitos T y es característica la presencia

de auto-anticuerpos en sangre contra insulina, ácido glutámicodecarboxilasa, tirosinfosfatasa IA-2 y tirosinfosfatasa IA-2B, entre otros[66].

3.2.2 Diabetes tipo 2

El término diabetes tipo 2 no designa una única enfermedad sino una colección heterogénea de síndromes hiperglucémicos fenotípica y genotípicamente distintos. Antes conocida como diabetes no dependiente de insulina o diabetes del adulto, representa el 90-95% de los casos de diabetes y comprende a los pacientes que tienen resistencia a insulina y frecuentemente una deficiencia relativa de insulina (inicialmente y a menudo a lo largo de su vida, estos pacientes no necesitan tratamiento de insulina).

Es muy habitual que la diabetes tipo 2 no sea diagnosticada hasta al cabo de los años de padecerla, ya que la hiperglucemia se desarrolla gradualmente y en estados tempranos a menudo no es tan severa como para que el paciente detecte ninguno de los síntomas clásicos. Sin embargo, estos pacientes tienen un riesgo elevado de desarrollar complicaciones vasculares.

A pesar de que los pacientes diabéticos tienen niveles de insulina normales o incluso elevados, los altos niveles de glucosa en sangre harían esperar unos valores de insulina aún mayores si tuvieran intacta su función de células β pancreáticas. La causa de esta observación se debe a que en el desarrollo de la enfermedad, en una primera etapa (prediabetes), los tejidos sensibles a la acción de la insulina (particularmente el musculo esquelético, el hígado y el tejido adiposo), debido a la interacción de una serie de factores como la predisposición genética, la poca actividad física y el exceso de ingesta de nutrientes, pierden la capacidad responder a ésta y captar glucosa, dando lugar a la resistencia a insulina. En respuesta a este fenómeno, las células β pancreáticas incrementan la secreción de insulina para mantener la tolerancia normal a la glucosa, pero cuando los niveles de glucosa en ayunas superan los 140 mg/dL, las células β son incapaces de mantener la elevada tasa de secreción de insulina y las concentraciones de insulina comienzan a disminuir progresivamente. Por lo tanto, la secreción de insulina es deficiente en estos pacientes e insuficiente para compensar su resistencia a insulina, y esto conduce a la diabetes[67].

La mayoría de pacientes con este tipo de diabetes son obesos, y la obesidad causa por sí misma cierto grado de resistencia a insulina. Además, pacientes no obesos según criterios de peso tradicionales, pueden tener un porcentaje elevado de grasa localizado predominantemente en la región abdominal. La resistencia a insulina podría mejorar con una reducción de peso y/o tratamiento farmacológico de la hiperglucemia, pero raramente se restaura a niveles normales. El riesgo de desarrollar diabetes aumenta con la edad, la obesidad, y la falta de ejercicio físico, así como antecedentes de hipertensión o dislipemia.

3.2.3 Otros tipos de diabetes

Diabetes gestacional: se refiere a una hiperglucemia con distintos grados de severidad, diagnosticada por primera vez durante el embarazo y que suele resolverse en las 6 semanas posteriores al parto.

Debidas a defectos genéticos: las formas tipo MODY (siglas en inglés de "Maturity Onset Diabetes of the Young") son variantes monogénicas debidas a mutaciones autosómicas dominantes en genes (hasta la fecha se han detectado 7) que afectan la función β-pancreática y en las que los enfermos debutan con menos de 25 años y no requieren insulina.

4. TEJIDO ADIPOSO

El tejido adiposo es uno de los tejidos más abundantes del ser humano. Constituye entre el 15% y el 20% del peso corporal en los hombres, y entre el 20% y el 25% en las mujeres, y se encuentra ampliamente distribuido por el organismo[68].

A pesar de haber sido considerado únicamente como un órgano pasivo de almacenamiento de energía y amortiguación mecánica, la investigación en las últimas décadas ha redefinido sus funciones. El tejido adiposo juega un papel crucial en la regulación y la disfunción patológica de la homeostasis energética. En mamíferos, la homeostasis energética es un compromiso entre el aporte y el gasto energético y, en buena parte, el equilibrio se consigue a través de la respuesta coordinada entre el sistema nervioso y el tejido adiposo, siendo este último el regulador del equilibrio entre la disponibilidad y la demanda de nutrientes, almacenando el exceso de calorías y evitando la acumulación tóxica de nutrientes en tejidos no adiposos[69]. Sin embargo, el tejido adiposo también se comunica con órganos metabólicamente relevantes mediante la secreción de adipoquinas, formando parte de un dinámico sistema endocrino[70].

El tejido adiposo en mamíferos está compuesto por lo menos de dos tipos de grasa funcionalmente distintas: el tejido adiposo blanco y el marrón o pardo (Figura 8).

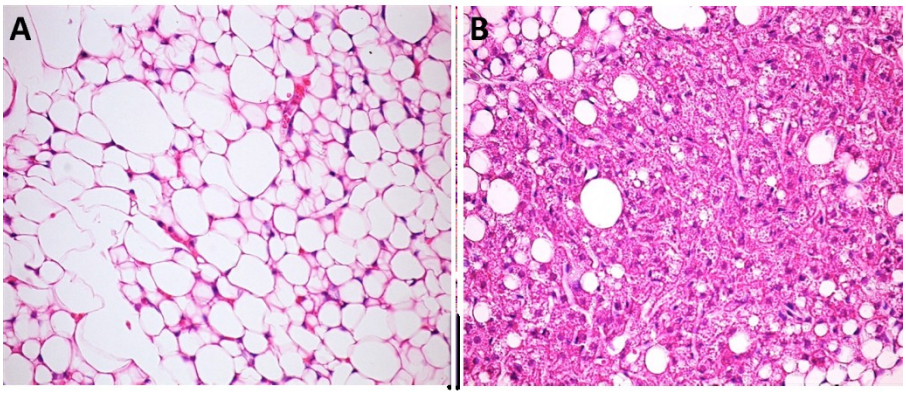


Figura 8. Cortes histológicos de tejido adiposo blanco (A) y tejido adiposo marrón (B).

4.1 Tejido adiposo marrón

El tejido adiposo marrón o pardo es un órgano termogénico especializado, encargado de generar calor en respuesta a una exposición a temperaturas bajas. Este tejido sólo se encuentra en pequeñas cantidades en recién nacidos, donde probablemente sirve para contrarrestar la pérdida de calor asociada al cambio abrupto hacia el ambiente extrauterino. Con la edad, la cantidad de este tejido disminuye y se hace difícilmente distinguible en aspecto del tejido adiposo blanco. No obstante, en la última década, el uso de tomografía computarizada combinada con tomografía de emisión de positrones ha permitido identificar cantidades significativas de tejido adiposo marrón funcional en algunos humanos adultos. Éste está principalmente localizado en la base del cuello y se activa metabólicamente con la exposición al frío[71].

Los adipocitos del tejido adiposo marrón son multiloculares, con muchas pequeñas gotas lipídicas, un núcleo central y gran cantidad de mitocondrias. Estas células pueden alcanzar un diámetro de 60µm, y contener gotas lipídicas de hasta 25 µm de diámetro. El color marrón característico de este tejido se debe a la elevada densidad de mitocondrias pero también a una rica vascularización[72].

La activación del tejido adiposo marrón resulta en una rápida inducción de la lipólisis intracelular, resultando en la liberación de ácidos grasos a partir de los triglicéridos de las gotas lipídicas. Los ácidos grasos se dirigen a la mitocondria donde pueden activar alostéricamente la Uncoupling protein 1 (UCP1) en la membrana de la mitocondria o bien oxidarse[73].

4.2 Tejido adiposo blanco

Es el tejido principal de reserva energética y liberación de hormonas y citoquinas. Además, puede actuar como aislante térmico y proteger otros órganos de daños físicos[74].

Los adipocitos maduros en este tejido se caracterizan por tener una sola vesícula lipídica que ocupa casi todo el volumen celular (sobre el 90%) quedando el citosol, los orgánulos y el núcleo en una estrecha franja periférica. Tienen una característica forma esférica que puede variar mucho en cuando a la medida (de 20 a 200µm de diámetro). Los adipocitos en desarrollo, sin

embargo, son transitoriamente multiloculares, mostrando múltiples pequeñas gotas lipídicas antes de que se unan en una única gran gota[75]. La mayor parte del contenido lipídico almacenado en estas células está en forma de triacilglicéridos (constituidos principalmente por ácido oleico y palmítico) y en menor grado por diacilglicéridos, fosfolípidos, ácidos grasos no esterificados y colesterol, los cuales son constantemente movilizados y renovados incluso en una situación de balance energético[76].

4.2.1 Tejido adiposo subcutáneo *vs.* visceral

El tejido adiposo blanco se puede dividir en dos subtipos: subcutáneo y visceral. Estos dos depósitos tienen una distinta localización anatómica: mientras el tejido adiposo subcutáneo se encuentra debajo de la piel, el tejido adiposo visceral está en el interior de las cavidades torácica y abdominal, alrededor de los órganos (Figura 9). Esta diferente localización parece definir diversas características esenciales, incluyendo el tiempo de desarrollo, la apariencia, la firma molecular, el perfil de expresión de citoquinas y la función biológica. Cada depósito tiene una morfología y textura específica. Histológicamente, el tejido adiposo subcutáneo es heterogéneo y contiene adipocitos uniloculares maduros intercalados con pequeños adipocitos multiloculares, mientras que la grasa visceral es más uniforme y parece estar constituida únicamente de grandes adipocitos uniloculares[77]. Curiosamente, el depósito retroperitoneal, clasificado como visceral, tiene características intermedias entre el tejido adiposo subcutáneo y el de otros depósitos viscerales.

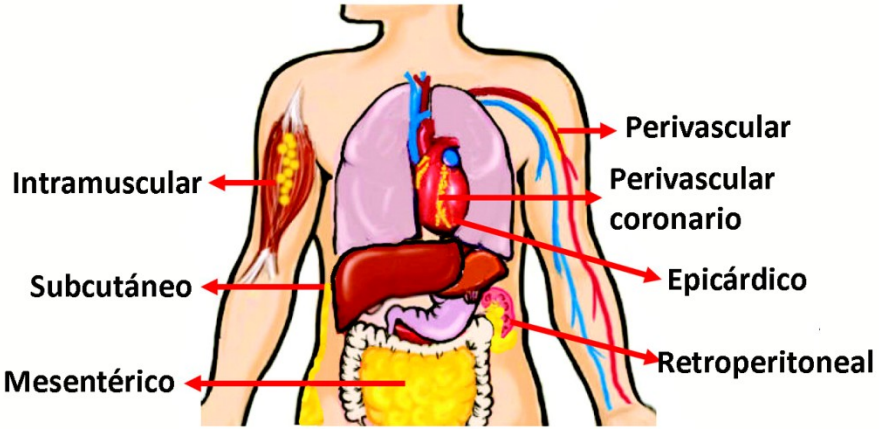


Figura 9. Distribución de los principales depósitos de tejido adiposo blanco en humanos. Figura adaptada de Britton K.A. y colaboradores, 2011 [78].

Actualmente se reconoce que los diferentes depósitos de grasa podrían tener distintas contribuciones al metabolismo. Un aumento en la masa adiposa subcutánea podría ser protectora frente a ciertos aspectos de la disfunción metabólica[79]. Por el contrario, un incremento de la grasa visceral está asociado a complicaciones metabólicas, así como al riesgo de padecer diabetes, hiperlipemia y enfermedad cardiovascular. Es por ello que el cociente cintura/cadera se ha usado como medida de obesidad central (Figura 10) para la evaluación de las consecuencias de salud asociadas a obesidad.

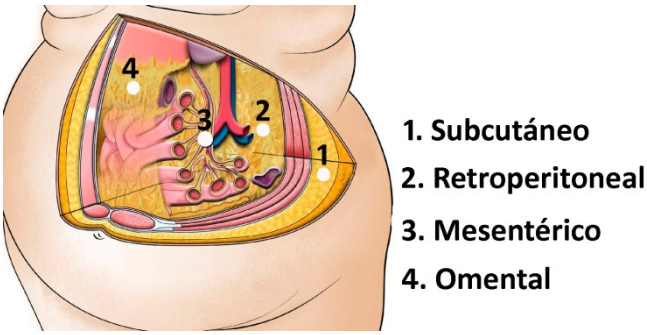


Figura 10. Distribución de los diferentes tejidos adiposos que contribuyen a la obesidad central o abdominal. Figura adaptada de Tchernof A., 2013 [80].

Existen varias hipótesis sobre los mecanismos subyacentes a estas diferencias. Una de ellas es que la proximidad de los depósitos viscerales a la circulación portal facilitaría el flujo de citoquinas, ácidos grasos libres y otros metabolitos hacia el hígado, donde podría producir efectos nocivos [81].

Por otro lado, se ha sugerido que las dispares propiedades metabólicas de estos tejidos podrían ser consecuencia de diferencias intrínsecas en las células que los forman así como de su diferente capacidad de expansión[82]. Existen evidencias de que los depósitos subcutáneos tienen una mayor habilidad para generar adipocitos, mientras que los depósitos viscerales tienen menos capacidad de adaptarse a un exceso de energía, dando lugar a una respuesta hipertrófica [83].

El aumento del tejido adiposo tanto durante el desarrollo normal como en una situación de obesidad es el resultado de un incremento en número y tamaño de adipocitos. Ya que los adipocitos maduros no son capaces de dividirse *in vivo*, la generación de nuevos adipocitos depende de la capacidad de auto-renovación

de una reserva de progenitores adipocíticos que permanecen durante la vida adulta[84].

Los progenitores adipocíticos derivan de las células madre mesenquimales que se encuentran en la fracción vascular del estroma (SVF) del tejido adiposo (ver apartado 4.3), que en respuesta a determinados estímulos generan nuevos adipocitos en un proceso llamado adipogénesis.

La adipogénesis se describe generalmente como un proceso de dos etapas. La primera fase comprende la generación de los progenitores adipocíticos a partir de células madre mesenquimales. La segunda fase consiste en la diferenciación terminal de estos progenitores en adipocitos maduros funcionales. A diferencia del proceso terminal de diferenciación adipocítica, que ha sido ampliamente estudiado, los mecanismos moleculares que controlan la auto-renovación de los progenitores adipocíticos son aún desconocidos, así como las posibles diferencias intrínsecas de estos últimos en función del depósito de tejido adiposo en el que residen.

4.2.2 Tejido adiposo epicárdico y perivascular coronario

En los últimos años, el tejido adiposo que rodea el corazón ha tomado una gran relevancia en el estudio de las enfermedades cardiovasculares, convirtiéndose en un potencial factor predictivo del riesgo cardio-metabólico así como en una posible diana terapéutica[85].

En el corazón adulto, el **tejido adiposo epicárdico** se encuentra normalmente en los surcos atrioventricular e interventricular, extendiéndose hasta el ápex. También se encuentran pequeñas cantidades de grasa en las paredes de las aurículas y entorno a los dos apéndices auriculares (Figura 11). A medida que aumenta la cantidad de grasa, ésta llena progresivamente el espacio entre los ventrículos, en ocasiones cubriendo por completo la superficie epicárdica. Por último, los tramos superficiales (no internalizados en el miocardio) de las arterias coronarias están recubiertas de grasa, que se considera también epicárdica por su localización pero corresponde al depósito de tejido adiposo perivascular, detallado más adelante. A menudo, siguiendo la adventicia de las ramas de las arterias coronarias, una pequeña cantidad de grasa se extiende también desde la superficie epicárdica hacia el miocardio[86].

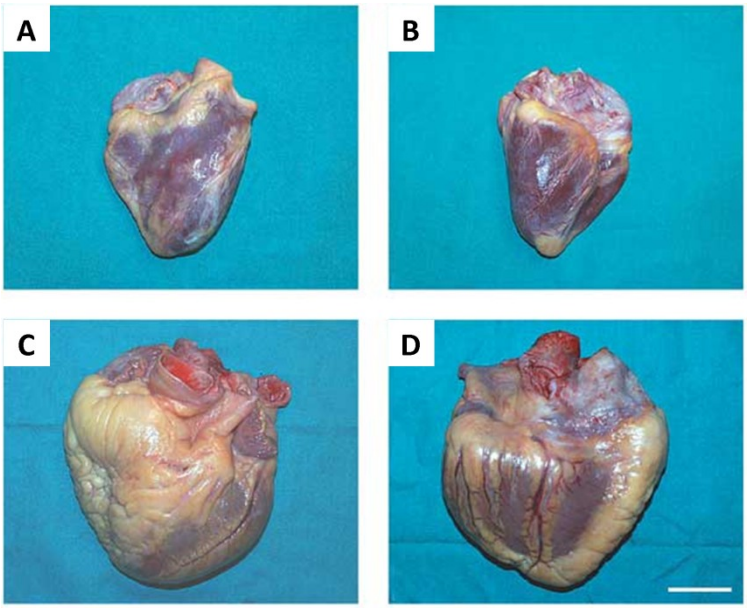


Figura 11. Apariencia macroscópica del tejido adiposo epicárdico. Vista anterior (A) y posterior (B) de un corazón normal (210g). Vista anterior (C) y posterior (D) de un corazón hipertrófico (900g). En el corazón normal, la distribución de la grasa se limita a los surcos atrioventricular e interventricular, además de recubrir las arterias coronarias. En el corazón hipertrófico el tejido adiposo cubre también los espacios entre esas regiones. Barra de escala = 4 cm. Figura adaptada de Iacobellis y colaboradores, 2005 [86]

El tejido adiposo epicárdico es rico en ácidos grasos saturados y tiene un alto contenido proteico, además, en comparación con los demás depósitos de grasa es el que tiene mayor capacidad de almacenar y liberar ácidos grasos libres (AGL)[87,88]. En condiciones fisiológicas, este mayor contenido y metabolismo de AGL es importante para la funcionalidad del miocardio, ya que en el corazón la energía se produce principalmente mediante la oxidación de ácidos grasos. El flujo de AGL hacia la arteria coronaria está facilitado por receptores específicos y citoquinas vasoactivas secretadas por la grasa epicárdica para regular el tono vascular. Este mecanismo asegura que el miocardio esté protegido de una exposición excesiva a altos niveles de AGL[89]. Sin embargo, el balance entre las propiedades fisiológicas y fisiopatológicas de la grasa epicárdica es delicado y susceptible a factores externos e internos, por lo que su intensa actividad metabólica sumada a su localización podría contribuir a desequilibrarlo. En conjunto, parece haber una íntima relación anatómica y funcional entre los componentes adiposos, musculares y vasculares del corazón. Esos componentes comparten el mismo suministro sanguíneo coronario y no existen

estructuras semejantes a las fascias (tal y como se encuentran en el músculo esquelético) que los separen.

El **tejido adiposo perivascular** envuelve la mayoría de arterias, incluso de diámetro pequeño, a excepción de los vasos sanguíneos del cerebro[90]. Aparece contiguo a la capa adventicia y sus características pueden variar en función del tipo de vaso sanguíneo. En comparación con los adipocitos de tejido adiposo subcutáneo, se ha descrito que los adipocitos perivasculares de arterias coronarias humanas están menos diferenciados y tienen un perfil de secreción de citoquinas más inflamatorio en contraste con una menor producción de adiponectina [91]. Históricamente, se consideró el tejido adiposo perivascular como un tejido estructural, sin embargo hoy en día se reconoce como un órgano endocrino metabólicamente activo con efectos importantes en la función vascular. Además, su proximidad con la adventicia vascular permite la comunicación entre ambos ambientes, tanto de forma paracrina como mediante el contacto directo célula-célula.

El volumen de tejido adiposo epicárdico aumenta en personas obesas, y es significativamente mayor en pacientes con síndrome metabólico[92]. Ha sido asociado con aterosclerosis sub-clínica, diabetes y resistencia a insulina[93,94], pero uno de los hallazgos que la hacen tan interesante a nivel clínico es que ha sido ampliamente asociada con la presencia y la severidad de la enfermedad arterial coronaria. Diversos estudios han demostrado que en las zonas en que la arteria coronaria se interna en el miocardio, dejando de tener contacto directo con el tejido adiposo, se encuentra una reducción significativa de placa aterosclerótica en comparación con las secciones rodeadas de grasa[95,96]. Además, la severidad de estas lesiones correlaciona directamente con el volumen de grasa epicárdica[97].

Actualmente existen evidencias que sugieren una contribución de la grasa epicárdica y perivascular coronaria al desarrollo y la progresión de la aterosclerosis de forma independiente a los factores de riesgo tradicionales[98–100], sin embargo se desconocen los mecanismos precisos y los tipos celulares implicados en este proceso.

4.3 Tipos celulares del tejido adiposo blanco

Los **adipocitos**, las células especializadas de este tejido, constituyen alrededor del 60-70% de la masa adiposa en adultos y sus funciones principales son el metabolismo lipídico y la señalización paracrina mediante la secreción de adipoquinas (Tabla 3).

Una alteración en el balance metabólico entre los procesos de lipogénesis y lipólisis puede derivar en un aumento de ácidos grasos circulantes, situación que asociada a un aumento de peso puede desencadenar una resistencia a la insulina. Este efecto es debido a que además su función como moléculas energéticas, los ácidos grasos actúan también como señales reguladoras de la expresión génica de proteínas implicadas en el metabolismo lipídico[101], pueden crear un estado protrombótico y se asocian con procesos inflamatorios[102]. Es por ello que uno de los mayores vínculos entre la obesidad y el desarrollo del síndrome metabólico y la enfermedad cardiovascular es el exceso de ácidos grasos circulantes (lipotoxicidad). En situaciones con un mayor consumo de calorías respecto a su gasto, se produce un estado metabólico en el que se promueve la hipertrofia (aumento del tamaño) y la hiperplasia (incremento del número) de los adipocitos[103], lo que implica la movilización de las células progenitoras hacia el linaje adipocítico (adipogénesis). Los adipocitos nuevos o de pequeño tamaño son más insulino-sensibles, y presentan una gran capacidad de captar ácidos grasos libres y triglicéridos presentes en el período postpandrial[104]. A medida que los adipocitos aumentan de tamaño (hipertrofia), se vuelven disfuncionales, pierden su capacidad protectora contra la lipotoxicidad sistémica, y la grasa empieza a acumularse de forma ectópica. Estos adipocitos distendidos se hacen hiperlipolíticos y resistentes a la insulina.

Además de su implicación directa en el metabolismo energético, los adipocitos regulan la homeostasis energética mediante la liberación de señales endocrinas, paracrinas y autocrinas, que les permiten modular la actividad metabólica del tejido adiposo pero también de órganos como el hígado, el cerebro y el músculo.

El resto del tejido está compuesto por **la fracción vascular del estroma** (SVF, del inglés *Stromal Vascular Fraction*), que incluye células madre y progenitoras, macrófagos, fibroblastos, pericitos, células endoteliales, células musculares lisas, células sanguíneas y preadipocitos, inmersas en una matriz extracelular de

colágeno y fibras elásticas en un nicho vascular. Esta multicelularidad representa un amplio rango de dianas para un extensa comunicación autocrina-paracrina que se refleja en la habilidad del tejido adiposo de producir y responder a un gran número de señales endocrinas, metabólicas e inmunológicas, y en las múltiples funciones en las que está involucrado[76].

Los pericitos, junto con las células endoteliales y las células musculares lisas, forman la vasculatura del tejido adiposo. La extensión de esta red capilar y las características de las células endoteliales son determinantes para el desarrollo de procesos como el crecimiento, la funcionalidad y el desarrollo del tejido adiposo, altamente irrigado[105]. Esta elevada vascularización facilita una alta presencia de células sanguíneas: monocitos, macrófagos, eritrocitos, linfocitos, eosinófilos, neutrófilos y mastocitos. Se ha observado que el tejido adiposo ejerce un gran control en el metabolismo del organismo a través de las células del sistema inmune residentes en él. En condiciones normales, estas células están implicadas en la eliminación de los adipocitos necróticos, el remodelado de la matriz extracelular, la angiogénesis, la adipogénesis y el mantenimiento de la sensibilidad a la insulina. Sin embargo, en individuos obesos el número de de células del sistema inmune aumenta, éstas adquieren un fenotipo proinflamatorio, y liberan un gran número de citoquinas encargadas de reclutar y activar a otras células del sistema inmune que pueden inducir una resistencia a insulina en el tejido adiposo[106].

Por último, en el SVF se encuentran las células madre derivadas del tejido adiposo (ASC, del inglés Adipose-derived Stromal/Stem Cells), descritas en el apartado 5, y los preadipocitos. Estas poblaciones celulares son las encargadas de mantener la renovación de la población de adipocitos en condiciones normales, pero también están implicadas en la expansión del tejido adiposo que se da en situaciones patológicas como la obesidad. En respuesta a determinados estímulos inductores del proceso de diferenciación, las células progenitoras se comprometen hacia el linaje adipocítico y finalmente se diferencian a adipocitos maduros[84].

Adipoquinas	Función
Adiponectina	Sensibilidad a la insulina, inflamación
Adipsina	Inflamación
Angiotensina II	Homeostasis vascular
Angiotensinógeno	Homeostasis vascular
Apelina	Homeostasis vascular
Apolipoproteína E (ApoE)	Metabolismo lipídico
Enzima convertidora de angiotensina (ACE)	Homeostasis vascular
Factor de crecimiento de fibroblastos (FGF)	Proliferación y diferenciación, angiogénesis
Factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF)	Angiogénesis
Factor de crecimiento insulínico de tipo 1 (IGF-I)	Metabolismo lipídico, sensibilidad a la insulina
Factor de crecimiento neural (NGF)	Crecimiento y diferenciación tisular
Factor de crecimiento transformante beta (TGFβ)	Migración y adhesión celular, crecimiento y diferenciación tisular
Factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α)	Inflamación, sensibilidad a la insulina
Factor tisular (TF)	Homeostasis vascular, coagulación
Inhibidor del activador del plasminógeno (PAI-1)	Homeostasis vascular
Interleucinas (IL-1β, IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, IL-18)	Inflamación; metabolismo lipídico
Leptina	Control de la ingesta, deposición de grasa, inflamación
Lipasa sensible a las hormonas (HSL)	Metabolismo lipídico
Lipoproteína lipasa (LPL)	Metabolismo lipídico
Molécula de adhesión intercelular-1 (ICAM-1)	Activación de macrófagos
Omentina	Sensibilidad a la insulina
Prostaglandina E2	Homeostasis vascular, inflamación
Prostaglandina I2	Homeostasis vascular, inflamación
Proteína C reactiva (CRP)	Inflamación
Proteína de unión a retinol-4 (RBP-4)	Metabolismo lipídico
Proteína quimioatrayente de monocitos-1 (MCP-1)	Incorporación de macrófagos al tejido
Proteína transferidora de ésteres de colesterol (CETP)	Metabolismo lipídico
Resistina	Sensibilidad a la insulina, inflamación
Vaspina	Sensibilidad a la insulina
Visfatina	Sensibilidad a la insulina, inflamación

Tabla 3. Adipoquinas liberadas por el tejido adiposo blanco y función fisiológica. Tabla adaptada de Esteve Ràfols M., 2014 [107].

4.4 Inflamación del tejido adiposo

La disfunción del tejido adiposo se manifiesta mediante un perfil de secreción de citoquinas pro-inflamatorias, que actúa a nivel paracrino y endocrino, y por la infiltración de células inflamatorias (especialmente en el tejido adiposo visceral). Las alteraciones en la función del tejido adiposo son consecuencia de la interacción de factores genéticos, ambientales y del estilo de vida. Estas alteraciones derivan en una hipertrofia de los adipocitos, acumulación ectópica de grasa, zonas hipóxicas, estrés celular, afectación de la función mitocondrial y la aparición de procesos inflamatorios en el tejido adiposo[108].

En una situación de exceso de energía como la obesidad, los lípidos intracelulares sobrecargan el retículo endoplásmico, lo que induce estrés en el mismo, y a su vez estimula vías inflamatorias. Por otro lado, los adipocitos secretan citoquinas pro-inflamatorias (*interleukin-6* (IL-6), *interleukin-8* (IL-8), *tumor necrosis factor alpha* (TNFα) y *nuclear factor kappa B* (NFkB) que provocan el reclutamiento de células inmunes. La acumulación de macrófagos activados en el tejido induce inflamación local, que da lugar a necrosis en el tejido adiposo y a su vez a la infiltración de macrófagos circulantes. La inflamación local causa alteraciones en la diferenciación de los preadipocitos y una reducción del almacenamiento de lípidos, además de la disrupción de la producción de adipoquinas como la adiponectina y la leptina. Como consecuencia de estos efectos se produce resistencia a insulina en el tejido adiposo y una acumulación ectópica de grasa[109] (Figura 12). La inflamación del tejido adiposo incrementa la lipólisis y resulta en elevadas concentraciones de AGL en circulación y dislipemia. El exceso de AGL sedimenta en otros tejidos como el músculo esquelético y el hígado. Estos órganos son de los principales consumidores de glucosa en el organismo, y el exceso de AGL puede producir en ellos disfunción metabólica e hiperglucemia.

De este modo, un aumento de la masa de tejido adiposo contribuye directamente al aumento de la inflamación sistémica. Numerosos estudios han descrito una correlación entre el IMC y un incremento de los niveles circulantes de proteínas inflamatorias como *C-reactive protein* (CRP), IL-6, *plasminogen activator inhibitor 1* (PAI-1), *P-selectin*, *vascular cell adhesion molecule 1* (VCAM-1), y *α1-acid glycoprotein* (AGP). Considerando que los adipocitos y macrófagos activados de la grasa producen todos esos factores, se puede

deducir que el tejido adiposo tiene una contribución importante en el incremento de estas moléculas a nivel sistémico[110].

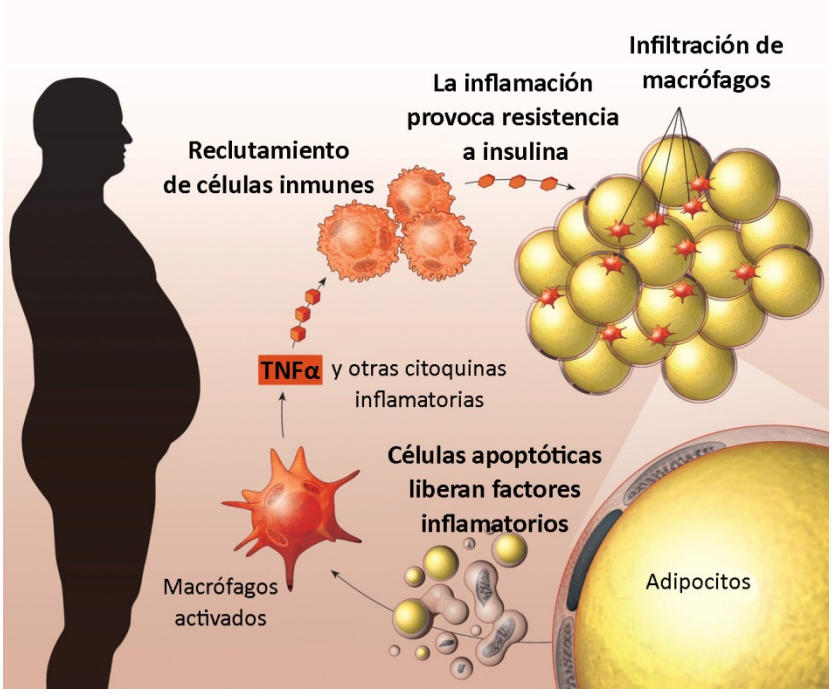


Figura 12. Inflamación del tejido adiposo. Como resultado de las cantidades excesivas de lípidos almacenadas, los adipocitos estresados liberan factores pro-inflamatorios y en ocasionas inician la apoptosis. Esto resulta en la activación de macrófagos que liberan TNF α entre otras citoquinas pro-inflamatorias, que reclutan y activan más células inmunes. La inflamación sostenida en el tiempo provoca la aparición de resistencia a insulina en el tejido. Figura adaptada de Odegaard J. y colaboradores, 2012 [111].

Se ha reportado que la inflamación sistémica está presente antes de cualquier evidencia de infarto de miocardio. Inicialmente esto se interpretó como una respuesta inflamatoria al daño vascular ateromatoso. Sin embargo, puede haber una explicación alternativa que sugiere que la inflamación sistémica está causando la aterosclerosis más que siendo resultado de ésta. Esta interpretación está apoyada por la observación de que pacientes con enfermedades inflamatorias preexistentes de origen inmune o infeccioso tienen un riesgo cardiovascular dramáticamente elevado en edades tempranas[112,113]. Es necesario, sin embargo, un mejor conocimiento de los mecanismos que causan o mantienen la disfunción de los adipocitos y la

inflamación del tejido adiposo, para poder desarrollar estrategias terapéuticas en el tratamiento de las complicaciones metabólicas que les suceden.

5. CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES DERIVADAS DE TEJIDO ADIPOSO

Las células madre, células no especializadas que pueden auto-renovarse y diferenciarse a tipos celulares más especializados, se dividen en dos clases principales: las células madre embrionarias y las células madre adultas.

Las células madre embrionarias emergen durante las fases tempranas del desarrollo embrionario y dan lugar a todas las células del organismo, por lo que son designadas como pluripotentes. Las células madre adultas, en cambio, son células más especializadas que se pueden encontrar en varios tejidos adultos y que pueden tener distinta capacidad de diferenciación; entre ellas se encuentran las células madre mesenquimales (MSC, del inglés *Mesenchymal Stem Cells*).

Las MSC son células multipotentes no hematopoyéticas de morfología fibroblastoide que pueden encontrarse en una gran variedad de tejidos adultos (tejido nervioso, médula ósea, tejido adiposo o pulpa dental entre otros) y que están involucradas en procesos fisiológicos y patológicos, incluyendo el mantenimiento de la homeostasis celular, el envejecimiento, el daño tisular y patologías inflamatorias[114,115].

En 2001, un grupo de investigación de la universidad de California identificó y describió una población de células madre multipotentes a las que llamaron PLA, del inglés *Processed LipoAspirate,* debido a que derivaban del tejido lipoaspirado obtenido en una cirugía plástica de liposucción[116]. Estas células se aislaron mediante la digestión enzimática del tejido, y la posterior siembra de la fracción vascular del estroma. El cultivo resultante fue una población relativamente homogénea, sin presencia de otras poblaciones contaminantes, y que presentaba características de MSC, ya que eran capaces de expresar fenotipos característicos de adipocitos, osteoblastos y condrocitos. Además se demostró que poblaciones clonales derivadas de estas células eran también capaces de diferenciarse en los fenotipos anteriores, lo cual confirmó su identidad como células madre.

Desde su descubrimiento, estas células han sido objeto de miles de estudios, y a falta de un consenso en cuanto a su nomenclatura, se utilizaron diversos nombres para definirlas: *Processed LipoAspirate* (PLA) *cells*, *Adipose-Derived*

Adult Stem cells (ADAS), *Adipose Derived Adult Stromal Cells* (ADAS), *Adipose-Derived Stromal Cells* (ADSC), *Adipose Stromal Cells* (ASC), *Adipose Mesenchymal Stem Cells* (AdMSC), *preadipocytes* y *Adipose-derived Stromal/Stem Cells* (ASC). Esto genera confusión en la literatura científica, por lo que en 2006, la *International Fat Applied Technology Society* alcanzó un consenso para adoptar el término "Adipose-derived Stem Cells" (ASC) para definir la población multipotente, adherente al plástico (Figura 13), aislada a partir de tejido adiposo[117].

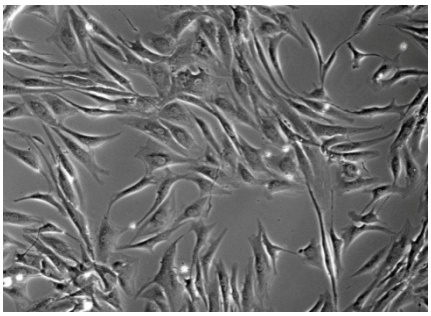


Figura 13. ASC de tejido adiposo coronario perivascular humano.

5.1 Localización

La auto-renovación y la diferenciación de las células madre están controladas tanto por factores intrínsecos como por el microambiente que las rodea, conocido como "nicho"[118]. El nicho representa un compartimento anatómico celular que provee señales (concentraciones de hormonas, matriz extracelular, gradientes de factores de crecimiento, hipoxia o estrés oxidativo) que controlan la tasa de proliferación de las células madre, así como su potencial de diferenciación, y las protege de envejecer o morir.

Muchos estudios se han esforzado en describir con exactitud la localización del nicho de las ASC, lo que supone un ejercicio complicado ya que no existe un único marcador específico e inequívoco que identifique ASC no diferenciadas (de la misma manera que ocurre con las MSC en general). Sin embargo, la aparición de nuevas técnicas de marcaje in situ están ayudado a caracterizar las ASC y sus posibles nichos en el tejido adiposo. Resultados obtenidos con técnicas histológicas sugieren que una o varias poblaciones de células madre podrían residir en la región perivascular, donde coexistirían con pericitos, células endoteliales y musculares. Concretamente, se han localizado ASC en

tejido adiposo perivascular, junto a la adventicia (Figura 14)[119,120]. Esta asociación con las zonas vasculares ha llevado a algunos autores a sugerir que las ASC (y las MSC en general) son un subtipo de pericitos o células madre/progenitoras vasculares en distintas fases de diferenciación localizadas en las paredes que rodean la vasculatura[121].

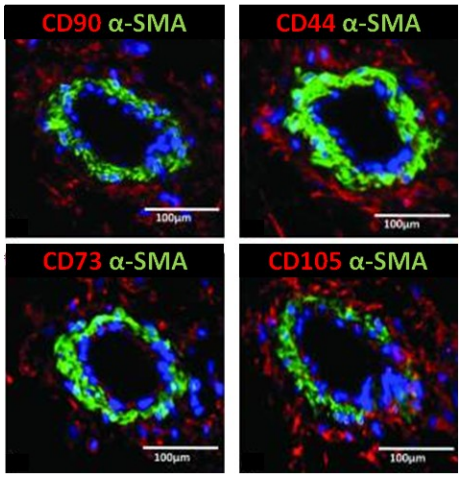


Figura 14. Tinción seriada de una arteria de tejido adiposo para marcadores de MSC (CD90, CD44, CD73 y CD105) y de célula muscular lisa (α-SMA; *smooth muscle actin alpha*). Los núcleos celulares están marcados en azul. Todos los marcadores de MSC co-localizan con la capa adventicia (que envuelve las células musculares lisas). Barra de escala = 100µm. Figura adaptada de Corselli y colaboradores, 2012 [120].

5.2 Fenotipo

En 2006, la *International Society for Cellular Therapy* (ISCT) propuso unos criterios mínimos para que una población celular pudiera ser definida como MSC:

1. Adherencia al plástico en condiciones estándar de cultivo.
2. Expresión de los marcadores de superficie CD73, CD90, CD105 (en ≥ 95% de células positivas en la población) y ausencia de los marcadores CD45, CD34, CD14 o CD11b, CD79α o CD19 y HLA-II (≤ 2% de células positivas), analizadas mediante citometría de flujo.
3. Capacidad de diferenciación *in vitro* a osteoblastos, adipocitos y condroblastos mediante condiciones de diferenciación estándar.

La primera y la tercera condición han sido invariablemente utilizadas desde entonces para definir la identidad de las ASC, sin embargo, existe una gran controversia en cuanto al fenotipado mediante marcadores de superficie en estas células. Uno de los principales problemas a la hora de establecer marcadores para las ASC (y las MSC en general) es la distinta expresión de estos en función del tiempo de cultivo. Ya sea por un enriquecimiento en determinadas poblaciones o por cambios en el fenotipo de las ASC, se ha demostrado repetidamente que se producen cambios en su perfil de expresión a lo largo del cultivo, de modo que existen grandes diferencias en los marcadores expresados por las ASC recién aisladas, en pases tempranos y en pases tardíos[122]. Es por este motivo que se recomienda utilizar una batería de marcadores positivos y negativos para caracterizar una población de ASC. En la Tabla 4 se resumen los principales marcadores actualmente aceptados para la identificación de ASC en cultivo.

Principales marcadores positivos (>80%)	Principales marcadores negativos (<2%)
CD13	CD31
CD29	CD45
CD44	CD235A
CD73	CD11b
CD90	CD14
CD105	CD26
CD166	CD106
CD34*	HLA-DR

Tabla 4. Resumen de los principales marcadores de superficie utilizados en la identificación de las ASC en cultivo[122,123]. *Marcador inestable, presente únicamente en ASC recién aisladas, por lo que en ocasiones ha sido utilizado por algunos autores como marcador negativo de ASC.

Las ASC en cultivo tienen una morfología fibroblastoide, se adhieren fácilmente al plástico y tienen una elevada tasa de proliferación.

La capacidad de diferenciación a tres de los linajes mesodérmicos (osteoblastos, adipocitos y condroblastos) es una de las características esenciales de las ASC. Sin embargo, numerosas publicaciones científicas han

demostrado que tienen la capacidad de diferenciarse a una amplia variedad de linajes celulares, tanto *in vitro* como *in vivo,* y que a pesar de tener un origen mesodérmico pueden diferenciarse hacia linajes de ectodermo y endodermo. Hasta ahora, mediante medios específicos de diferenciación se ha conseguido que las ASC expresen un fenotipo característico de célula endotelial, muscular lisa y estriada, epitelial, cardiomiocitos, neuronas, hepatocitos e incluso células β pancreáticas[124] (Figura 15). Habitualmente, la evaluación de multipotencia o de la diferenciación de las ASC a determinados linajes celulares se realiza mediante el análisis de los niveles de expresión de marcadores característicos de cada tipo celular así como de cambios morfológicos y de matriz extracelular.

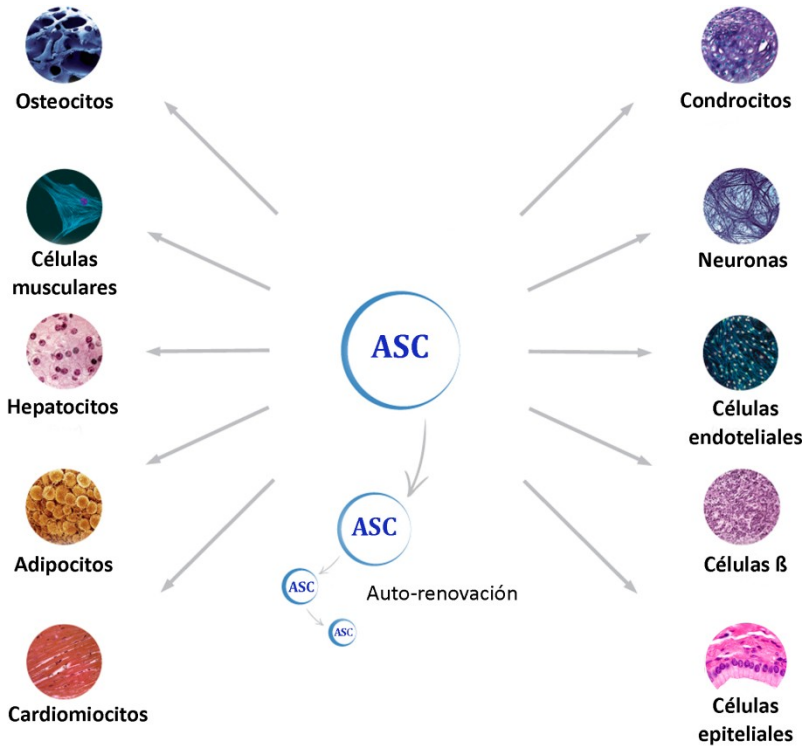


Figura 15. Potencial de diferenciación de las ASC. Se ha demostrado su capacidad de diferenciación hacia los linajes mesodérmico (osteocitos, condrocitos, adipocitos y miocitos), ectodérmico (neuronas, endotelio y epitelio) y endodérmico (cardiomiocitos, células β y hepatocitos).

5.3 Efectos inmunomoduladores

Las capacidades inmunomoduladoras de las ASC han sido evidenciadas mediante múltiples ensayos funcionales, y constituye una de las cualidades más relevantes de este tipo celular para su utilización como agente terapéutico.

Las ASC (igual que las MSC derivadas de médula ósea) no expresan HLA-DR (*Human Leukocyte Antigen - antigen D Related*, antígeno del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II), lo que las hace menos inmunogénicas que otros tipos celulares.

Además, numerosos estudios con ASC humanas y de modelos murinos han documentado la habilidad de éstas para liberar citoquinas y factores tróficos que juegan un papel esencial en sus propiedades inmunomoduladoras. Algunas de las citoquinas clave involucradas en la modulación de la respuesta inmune incluyen: *Tumor necrosis factor alpha* (TNF-α), *Interferon gamma* (IFN-γ), *Indoleamine 2,3-dioxygenase* (IDO, enzima limitante en el metabolismo del triptófano que está asociada con la supresión de la expansión de linfocitos T), y *Interleukin-17* (IL-17)[125,126]. Particularmente, se ha demostrado que TNF-α aumenta el efecto inmunosupresor de las ASC intensificando la producción de prostaglandina E2.

Las ASC han demostrado la capacidad de inhibir la producción de citoquinas inflamatorias, suprimir la proliferación de células T en un modo dosis-dependiente[127] y estimular la producción de citoquinas anti-inflamatorias y células T reguladoras[128] que a su vez son responsables de la supresión de respuestas inmunes[129].

Además, las ASC son capaces de suprimir la reactividad de los linfocitos en un ensayo de reacción linfocitaria mixta y de reducir la inflamación *in vivo*[130]. Estas propiedades inmunosupresoras juntamente con su estatus inmunoprivilegiado las hace buenas candidatas para ser utilizadas en trasplantes alogénicos.

5.4 Efectos pro-angiogénicos

Una de las propiedades más interesantes de las ASC es su capacidad para promover la neovascularización. Inicialmente, se atribuyeron sus efectos pro-angiogénicos a la diferenciación de las ASC hacia el linaje endotelial, ya que se observaron tanto marcadores característicos de célula endotelial en estas

células cultivadas *in vitro*, como una mayor neovascularización de tejidos isquémicos *in vivo* cuando se inyectaban ASC no diferenciadas[131,132]. No obstante, otros autores reportaron evidencias de la importancia del secretoma de estas células en los efectos observados. En estos estudios, la exposición a ambientes hipóxicos o matrices tridimensionales aumentó drásticamente en las ASC la secreción de los principales factores de crecimiento angiogénicos: *vascular endothelial growth factor* (VEGF), *hepatocyte growth factor* (HGF), *transforming growth factor-beta* (TGF-β), *interleukin 8* (IL-8), *basic fibroblast growth factor* (bFGF) y *stromal cell-derived factor-1* (SDF-1)[133–135]. La secreción de estos factores de crecimiento tiene efectos pro-angiogénicos sinérgicos, con propiedades anti-apoptóticas, y además es capaz de inducir la proliferación de células endoteliales, y la migración y reclutamiento de otras células necesarias para la estabilidad vascular.

Adicionalmente se ha descrito en las ASC la capacidad de estimular la formación de redes vasculares en matrices tridimensionales, además de un fenotipo y función similar a los pericitos observado en co-cultivos con células endoteliales (Figura 16), que puede jugar un papel en la maduración y remodelado de los vasos sanguíneos[136–138].

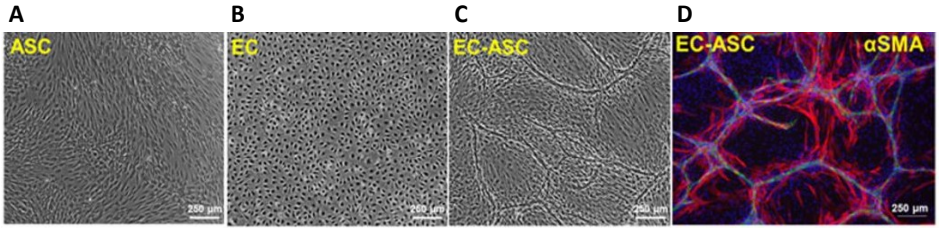


Figura 16. Formación de redes vasculares en co-cultivos de ASC y células endoteliales (EC). (A-C) Imágenes en microscopio de contraste de fases de ASC, EC y co-cultivo de ASC y EC. (D) Inmunofluorescencia para los marcadores smooth muscle actin alpha (αSMA, rojo), CD31 (verde) y nucleos (azul) en un co-cultivo de ASC y EC. Barra de escala = 250µm. Figura adaptada de Merfeld-Clauss y colaboradores, 2014 [137].

En resumen, las ASC poseen interesantes cualidades pro-angiogénicas y regenerativas que en respuesta a determinados estímulos, incluyen en una acción combinada el reemplazo de células dañadas, la diferenciación a células vasculares, la formación de estructuras vasculares por contacto célula-célula, y por último, y al parecer un factor clave para promover la angiogénesis, la

secreción paracrina de factores de crecimiento pro-angiogénicos y anti-apoptóticos.

5.5 Uso terapéutico

La terapia celular se contempla como una opción novedosa en la reparación y regeneración tisular, que puede aplicarse a múltiples enfermedades. En la búsqueda de las células candidatas para ser utilizadas en este tipo de terapias, existen una serie de requisitos que incluyen:

- La posibilidad de ser obtenidas de forma abundante y poco invasiva para el donante.
- La capacidad de diferenciación a diversos celulares de manera controlada y reproducible.
- La posibilidad de trasplante de forma segura y eficaz, de forma autóloga y alogénica.
- La posibilidad de preparación según los estándares de control y calidad de las guías de Buenas Prácticas de Preparación.

Durante muchos años se han utilizado las MSC de médula ósea como fuente principal de células madre para medicina regenerativa, y como alternativa al uso de las células madre embrionarias[139]. Sin embargo, las ASC, que cumplen los requisitos antes enumerados, presentan una gran ventaja respecto a las anteriores debido a su fácil obtención y aislamiento[140]. Las características pro-angiogénicas e inmunomoduladoras, la capacidad de diferenciación a múltiples linajes celulares, y la cantidad de citoquinas y factores de crecimiento encontrados en el secretoma de las ASC, han propiciado su uso en multitud de ensayos pre-clínicos y clínicos. Los resultados iniciales no fueron tan exitosos como se esperaba en un principio, sin embargo, se observaron mejoras en algunos tratamientos que alentaron a investigadores y clínicos a optimizar el diseño del estudio y los procedimientos utilizados, en ocasiones complementando las ASC con matrices tridimensionales o factores de crecimiento. Actualmente las expectativas en terapia celular son tales que tanto la *Food and Drug Administration* (FDA) como la *European Medicines Agency* (EMEA) han empezado a regular su uso como agentes terapéuticos.

El número de ensayos clínicos utilizando ASC ha aumentado considerablemente en los últimos años, y actualmente existen más de dos cientos estudios

registrados en *ClinicalTrials.gov* [141]. España es uno de los países pioneros en este tipo de intervenciones, y en el 2014 ocupó la cuarta posición a nivel mundial de ensayos clínicos en terapia celular (Figura 17).

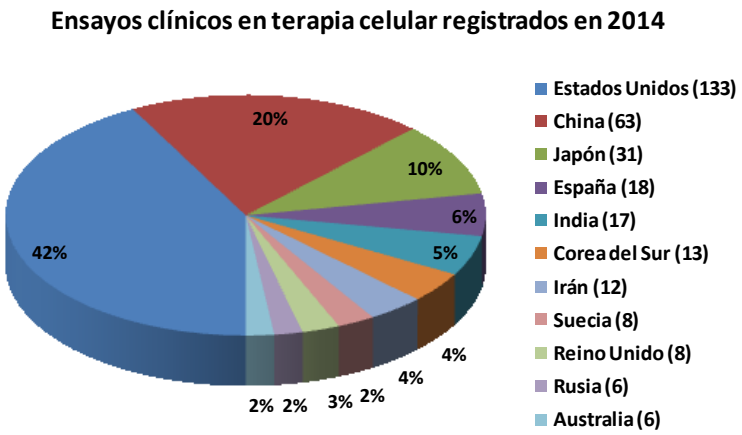


Figura 17. Ensayos clínicos en terapia celular registrados en 2014 por países. Datos obtenidos de Bersenev A., 2015[142]

Las ASC pueden ser utilizadas en un amplio rango de patologías clínicas, principalmente aquellas que involucran condiciones isquémicas o inmunológicas[143]. Sin embargo existen aún algunos aspectos dudosos en el conocimiento básico de la biología y las aplicaciones clínicas de las ASC, en lo referente a la identidad de esta población celular. La *International Federation for Adipose Therapeutics and Science* (IFATS) y la *International Society for Cellular Therapy* (ISCT) han realizado unas guías iniciales para indústria y academia sobre las propiedades de las ASC, incluyendo su viabilidad, inmunofenotipo estándar, proliferación y diferenciación. Esas características facilitan el desarrollo de nuevos criterios de valoración y aceleran la administración segura y efectiva de los tratamientos basados en el uso de ASC a la comunidad médica y los pacientes[144]. Sin embargo, aún es necesario seguir investigando en el área clínica y establecer las condiciones idóneas para los tratamientos en medicina regenerativa con una población celular tan prometedora como las ASC.

5.6 Diferencias entre ASC de distintas localizaciones adiposas

Los depósitos de tejido adiposo subcutáneo y visceral presentan características diferentes (ver apartado 4.2.1), lo que hace plausible que existan diferencias también entre las ASC que residen en dichos tejidos.

Existen estudios que demuestran diferencias tanto en la tasa de proliferación como en el patrón de expresión génica de las ASC de tejido adiposo subcutáneo en comparación con las de tejido adiposo visceral en pacientes con obesidad[145,146]. Además, en pacientes no obesos, las ASC de los distintos depósitos de grasa mantienen diferencias en la expresión génica, la secreción de adiponectina y la señalización mediante insulina cuando se diferencian *in vitro* a adipocitos[147] . Por lo tanto, las ASC residentes en los distintos tejidos adiposos poseen características metabólicas inherentes que se mantienen después de la diferenciación celular.

Sin embargo, hoy en día aún se desconoce cómo y en qué momento del desarrollo las ASC de los diferentes tejidos adiposos adquieren el fenotipo característico de cada tejido.

5.7 Efecto de los factores de riesgo sobre las células madre mesenquimales

Estudios recientes sugieren que una alteración de la homeostasis de las células madre debido a un constante y repetido estímulo nocivo puede provocar un desequilibrio persistente en el reservorio de éstas células, desencadenando una disminución prematura e irreversible de su potencial regenerativo.

Se ha descrito que la diabetes, uno de los mayores factores de riesgo cardiovascular, afecta negativamente a las MSC, ya que se ha observado una mayor expresión de marcadores de senescencia y apoptosis y una disminución de marcadores de supervivencia en las MSC obtenidas de médula ósea en pacientes diabéticos[148].

La edad por sí sola tiene también un impacto negativo sobre esta población celular, ya que su potencial de proliferación y diferenciación aparece reducido en individuos de edad avanzada[149]. Este efecto se ha podido observar también en las ASC. Varios estudios han demostrado que la edad disminuye su

capacidad de proliferación, así como su potencial angiogénico y de diferenciación[150,151].

La obesidad, por su parte, tiene también un impacto negativo en las MSC y en otras poblaciones como las células endoteliales progenitoras (EPC, del inglés *endothelial progenitor cells*). Los pacientes obesos presentan un menor número de EPC y con una menor capacidad clonogénica en comparación con individuos delgados[152], mientras en las MSC de médula ósea se ha observado una afectación de la respuesta osteogénica en individuos con un IMC elevado[153]. En el caso de las ASC, se ha observado una menor capacidad de diferenciación adipogénica en el tejido adiposo subcutáneo mamario en mujeres con un IMC elevado[154].

A pesar de que las ASC parecen ser susceptibles al impacto de situaciones patológicas del mismo modo que las MSC de médula ósea, no se han descrito aún los efectos que la diabetes o la acumulación de FRCV tienen sobre las propiedades de una población que reside en uno de los órganos más afectados en una situación de alteración metabólica como lo es el tejido adiposo.

6. VÍAS DE SEÑALIZACIÓN

La adquisición de diferentes destinos celulares orquesta una intrincada interacción de la proliferación, la migración, el crecimiento, la diferenciación y la muerte celular, dando lugar a conjuntos de distintos tipos celulares organizados de una manera precisa. Tanto factores intrínsecos celulares, como señales extrínsecas a corta y larga distancia, guían el desarrollo de nuevos tejidos y destinos celulares. Con frecuencia, un organismo utiliza la misma vía de señalización dentro de diferentes contextos celulares para alcanzar determinados objetivos de desarrollo.

6.1 Notch

La vía de señalización Notch es una vía conservada evolutivamente en organismos multicelulares que regula la determinación del destino celular durante el desarrollo y participa en el mantenimiento de la homeostasis tisular en el adulto. Esta vía media a través de señales celulares yuxtacrinas donde tanto la célula que expone el ligando como la célula receptora están afectadas por la comunicación ligando-receptor.

Los receptores Notch son proteínas transmembrana de aproximadamente 300 kDa compuestas por los dominios funcionales extracelular, transmembrana e intracelular (NICD, del inglés *Notch intracellular domain*). Existen cuatro receptores de esta familia en mamíferos (Notch 1-4) que se procesan en el retículo endoplasmático y en el aparato de Golgi mediante proteólisis y glicosilación. Una vez procesados, son transportados por endosomas a la membrana plasmática para permitir la unión a ligando. En mamíferos, los ligandos conocidos de los receptores Notch son 5, los miembros de las familias *Delta-like* (DLL1, DLL3, DLL4) y *Jagged* (JAG1, JAG2). Una vez se produce la unión ligando-receptor, el dominio extracelular es cortado por la enzima *TNF-α ADAM metalloprotease converting enzyme* (TACE). De este modo el dominio extracelular del receptor permanece unido al ligando y este complejo se internaliza por endocitosis en la célula presentadora de ligando y marcado para su degradación lisosomal. En la célula receptora, la porción restante del receptor es sometida a una escisión por γ-secretasas que libera el dominio intracelular NICD. Esto permite su traslocación al núcleo donde se asocia con el complejo de factores de transcripción CSL (CBF1/Suppressor of Hairless/LAG-1), resultando en la subsiguiente activación de los genes diana de la vía canónica

de Notch: los factores de transcripción pertenecientes a la familia Hes/Hey (Figura 18)[155–157]. No está tan claro, sin embargo, como actúa cada uno de esos factores de transcripción en los distintos tipos celulares ni en los procesos de diferenciación o mantenimiento de la multipotencia de las células madre.

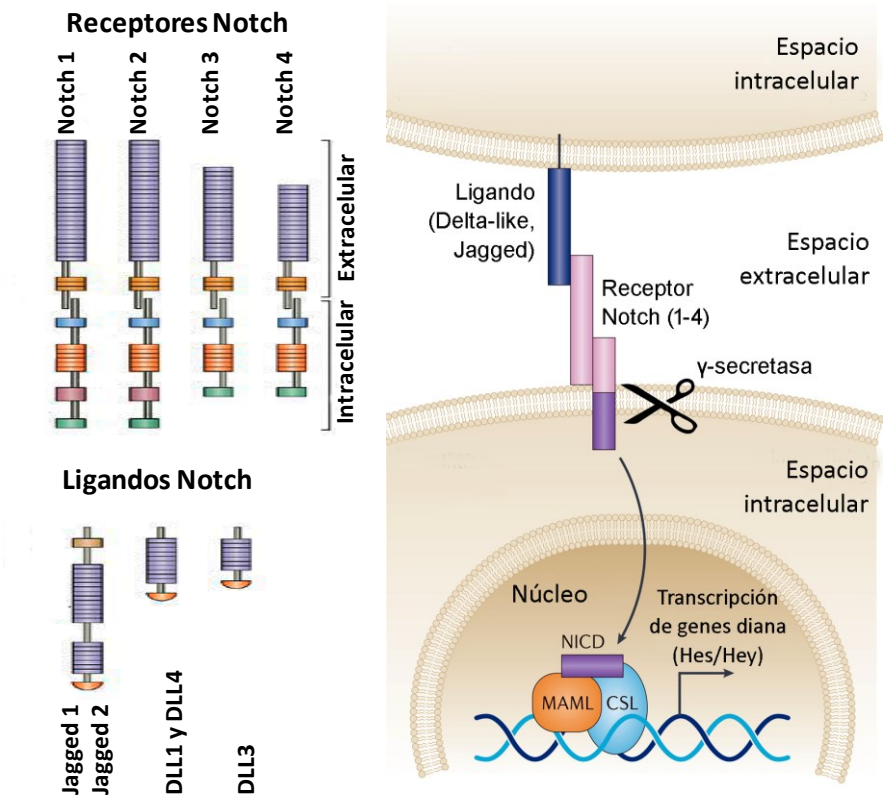


Figura 18. Mecanismo de acción de la vía de señalización Notch. A la izquierda, representación de los receptores y ligandos que participan en la vía. A la derecha, mecanismo mediante el cual se procesa el receptor después de la unión al ligando. La escisión del receptor Notch por enzimas γ-secretasas libera el dominio intracelular (NICD), que se trasloca al núcleo y se une a los co-factores *CBF1/Suppressor of Hairless/LAG-1* (CSL) y *mastermind-like* (MAML), activando la transcripción de genes diana. Figura adaptada de Osborne B. A. y colaboradores, 2007[156] y Andersson E. R. y colaboradores, 2014[157].

Se ha demostrado la participación de la vía de señalización Notch en la diferenciación específica de linaje de las células madre embrionarias, y en el control del número y actividad de las células madre adultas en contextos de degeneración tisular relacionada con la edad, reparación por daño tisular y

procesos tumorales malignos. En concreto, en las ASC se ha detectado la expresión de los componentes de la vía de Notch, y se ha demostrado su participación en la regulación de los procesos de diferenciación a varios linajes celulares[158–161].

7. ESTADO DE LA CUESTIÓN

Las enfermedades cardiovasculares, siendo habitualmente la manifestación clínica de la aterosclerosis, son la primera causa de muerte en el mundo[1]. En las últimas décadas, el estilo de vida en la población se ha ido modificando, siendo frecuentes las dietas poco equilibradas, el consumo excesivo de alcohol, el tabaquismo y la inactividad física. Esto ha derivado en un incremento importante de complicaciones metabólicas como la obesidad, la hipertensión, la dislipemia o la diabetes, las cuáles son importantes FRCV.

La relación de los FRCV con la función y homeostasis del tejido adiposo ha sido, hasta hace poco, escasamente investigada. De hecho, ha sido en los últimos años cuando la investigación de los mecanismos responsables del desarrollo de enfermedad cardiovascular ha tomado como importante objeto de estudio el tejido adiposo, ya que además de jugar un papel crucial en la regulación de la homeostasis energética, ha demostrado actuar como un potente órgano endocrino mediante la secreción de adipoquinas que participan en el metabolismo de la glucosa, el remodelado de la vascularización, la regulación de la presión arterial y la coagulación, entre otros procesos fisológicos[162,163]. En concreto, el tejido adiposo visceral (a diferencia del tejido adiposo subcutáneo) está estrechamente asociado a alteraciones metabólicas sistémicas[80], contribuyendo al desarrollo de la resistencia a insulina a través de un aumento de la liberación de ácidos grasos y en consecuencia, de la acumulación ectópica de grasa y el desarrollo de lipotoxicidad[164], lo cual se debe en parte a la menor capacidad de expansión de este tejido en comparación con la grasa subcutánea.

Por su localización y difícil obtención, actualmente existe mucha menos información sobre el papel del tejido adiposo epicárdico. No obstante, es un objetivo de estudio por su proximidad e íntimo contacto con el corazón y las arterias coronarias. Diversos estudios han demostrado que en las zonas en que la arteria coronaria se interna en el miocardio, dejando de tener contacto directo con el tejido adiposo, se encuentra una reducción significativa de placa aterosclerótica en comparación con las secciones rodeadas de grasa[95,96]. Sin embargo, no se conoce todavía la función de las posibles interacciones celulares y bioquímicas del tejido adiposo epicárdico y las células vasculares y miocárdicas subyacentes.

El tejido adiposo es una fuente de células madre mesenquimales adultas (ASC, del inglés adipose-derived stromal/stem cells). Se trata de células multipotentes, de fácil obtención, con interesantes propiedades pro-angiogénicas e inmunomoduladoras[143] y que han demostrado tener la capacidad de diferenciarse a múltiples linajes celulares, incluyendo células musculares, endoteliales, adipocitos y osteocitos entre otros[116]. Por estas características se consideran un candidato ideal para su uso en terapia celular y son objeto de numerosos estudios en medicina regenerativa. Sin embargo, es poco conocido el papel fisiológico que juegan las ASC en el desarrollo de la patología cardiovascular, y el impacto que los factores de riesgo cardiovascular tienen sobre su funcionalidad.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

El tejido adiposo ha demostrado ser un órgano clave en el desarrollo de patologías metabólicas que a menudo son un importante factor de riesgo cardiovascular. En especial, estudios clínicos y epidemiológicos han evidenciado que los depósitos de grasa viscerales están asociados a complicaciones metabólicas como la resistencia a insulina, y al desarrollo de enfermedad aterosclerótica. Este tejido es también una fuente de ASC, una población de células madre multipotentes con propiedades pro-angiogénicas e inmunomoduladoras, que si bien han sido incipientemente utilizadas en terapia regenerativa, se desconoce el papel que ejercen a nivel fisiológico durante el desarrollo de patologías metabólicas o cardiovasculares, así como el impacto que estas complicaciones tienen sobre su fenotipo y funcionalidad.

Existen, por tanto, muchas incógnitas respecto a la función de las ASC y a su diferenciación e interacción con células diferenciadas de su nicho celular, tanto en condiciones fisiológicas como patológicas. Por un lado, las diferencias en cuanto al riesgo metabólico, debido a la distinta capacidad de expansión, que tienen la grasa subcutánea y visceral pueden estar relacionadas con diferencias intrínsecas de las ASC en la capacidad de generar nuevos adipocitos. Por otro lado, las alteraciones sistémicas generadas por la acumulación de factores de riesgo pueden modificar el fenotipo de las ASC, incluyendo su potencial angiogénico. Estas modificaciones en la funcionalidad de las ASC, podrían tener consecuencias en las regiones perivasculares donde residen, participando de manera endógena en el desarrollo de enfermedad cardiovascular. Además, este efecto podría ser extensivo a otras MSC como lo son las derivadas de la médula ósea. Finalmente, es también desconocida la relación entre las ASC y las células diferenciadas presentes en el nicho celular.

En general, faltan estudios mecanísticos traslacionales que den explicación a nivel clínico de la función de las ASC.

En esta tesis se ha planteado como hipótesis de trabajo que **las ASC presentan distintas capacidades de diferenciación en función del tejido adiposo en el que residen, y que su potencial regenerativo está comprometido por la acumulación de factores de riesgo cardiovascular**.

Para dar respuesta a nuestra hipótesis, se definieron los siguientes objetivos:

I. Analizar las diferencias intrínsecas de las ASC de diferentes localizaciones adiposas en un modelo animal con acumulación de factores de riesgo cardiovascular.

II. Evaluar el impacto de la diabetes y la acumulación de factores de riesgo cardiovascular sobre el potencial angiogénico de las ASC de grasa subcutánea.

III. Evaluar el impacto de la acumulación de factores de riesgo cardiovascular sobre el potencial angiogénico de las ASC de grasa epicárdica.

IV. Evaluar el impacto de la acumulación de factores de riesgo cardiovascular sobre el nicho de las células madre de la médula ósea.

V. Caracterizar fenotípica y funcionalmente las ASC de tejido adiposo perivascular coronario de pacientes en diferentes estados de progresión de aterosclerosis coronaria.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. NOMENCLATURA

Los nombres de genes y proteínas de rata y humano siguen las pautas establecidas por el *Rat Genome Nomenclature Committee (RGNC)* y el *Human Genome Organization (HUGO) Gene Nomenclature Committee,* respectivamente.

En cuanto al uso de siglas o acrónimos, se ha mantenido la nomenclatura original correspondiente a la designación inglesa en el caso de nombres propios de genes, proteínas, moléculas, tipos celulares, modelos animales y técnicas, por su uso estandarizado entre la comunidad científica.

2. MODELO ANIMAL

Las ratas Zucker obesas fueron descubiertas en 1961 por Lois M. Zucker y Theodore F. Zucker en un cruce entre ratas Merck M y ratas Sherman[165]. Estas ratas presentan una mutación autosómica recesiva simple (sustitución de una glicina por una prolina en la posición 269) en el gen que codifica para el receptor de la leptina localizado en el cromosoma 5, lo que reduce 10 veces su afinidad por la leptina[166–168].

En condiciones normales, el tejido adiposo libera leptina a la circulación que actúa a nivel cerebral disminuyendo la ingesta e incrementando el consumo de energía. Sin embargo, en la ratas Zucker esta vía no funciona correctamente, por lo que a pesar de presentar niveles elevados de leptina circulantes, al cabo de 4 semanas, desarrollan hiperfagia y una obesidad temprana[169]. Además, presentan hiperlipemia e hipertensión, y desarrollan resistencia a insulina. Sin embargo, los niveles de glucosa de estas ratas permanecen normales, no desarrollando diabetes y presentando así un comportamiento similar al observado en un elevado porcentaje de los humanos obesos[167,170].

En este estudio se utilizaron ratas Zucker Diabetic Fatty (ZDF), una subespecie derivada de las ratas Zucker en las que se detectó una mutación espontánea (inicialmente observada en machos) que provocaba el desarrollo de diabetes, ya que son incapaces de compensar la resistencia a insulina. Alimentadas con una dieta Purina LabDiet® 5008, los animales homocigotos recesivos ZDF machos (fa/fa) desarrollan obesidad, hiperlipidemia, hiperglucemia postpandrial y finalmente diabetes mellitus tipo 2 a las ocho semanas de vida.

En su estado prediabético, el macho ZDF, inicialmente experimenta un incremento en su insulinemia basal y en la concentración de ácidos grasos libres. Una vez se desarrolla hiperglucemia (entre las 8 y 10 semanas), se colapsa la secreción de insulina y se convierten en diabéticas[171,172]. Las cepas homocigotas dominantes (+/+) y las heterocigotas (fa/+), permanecen delgadas y normoglucémicas[173], por lo que fueron utilizadas como animales control en esta tesis (ZC). En la 5 se detallan las características principales de las ratas ZC y ZDF.

Modelo animal:

Ratas Zucker Diabetic Fatty (ZDF)

y sus controles (ZC)

	ZC/Control	ZDF/CVRF
Mutación en el receptor de la leptina	+/+ o fa/+	fa/fa
Hiperfagia	No	Si
Obesidad	No	Si
Hiperglucemia	No	Si
Resistencia a insulina	No	Si
Hipertrigliceridemia	No	Si
Hipercolesterolemia	No	Si

Tabla 5. Comparativa entre las ratas Zucker Diabetic Fatty (ZDF) y los controles delgados normoglucémicos (ZC). CVRF: Factores de riesgo cardiovascular

Aunque las ratas ZC y ZDF fueron los modelos animales en los cuales se basa esta tesis, en uno de los estudios se utilizó un modelo de rata no obesa con diabetes mellitus inducida químicamente (ChDMII). La estreptozotocina es una sustancia con citotoxicidad específica que destruye las células β del páncreas causando un estado primario de deficiencia de insulina. Sin embargo, una destrucción completa de la función pancreática se asemejaría más a una

diabetes tipo 1 que a una diabetes tipo 2, en la que los pacientes tienen niveles de insulina detectables en sangre. La nicotinamida, una vitamina soluble del grupo B, tiene un efecto protector sobre las células β pancreáticas, llegando a preservar un 40% de la función pancreática cuando es administrada antes del tratamiento con estreptozotocina[174]. El uso de esta combinación permite obtener un modelo experimental homólogo de diabetes tipo 2 caracterizada por hiperglucemia moderada y ligero daño a las células pancreáticas. Para reproducir este modelo, se realizó una inyección intraperitoneal de 230mg/kg de nicotinamida a ratas ZC de 9 semanas de edad, 15 minutos antes de inyectar 65mg/kg de estreptozocina intravenosa por la vena de la cola.

2.1 Condiciones de estabulación

Todos los experimentos fueron aprobados por el Comité Ético de Experimentación Animal del Institut Català de Ciències Cardiovasculars y cumplen con los criterios establecidos en la guía *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* publicada por *the United States National Institutes of Health* (NIH, Publication No.85-23, revised 2011)[175]. Los animales se mantuvieron estabulados en un ambiente controlado a 20.0-22.0ºC, 60 % de humedad relativa y ciclos de día/noche de 12 horas. Recibieron una dieta estándar para ratas de laboratorio Purina LabDiet® 5008 (PMI Nutrition International) y agua, ad libitum. Este tipo de dieta estándar es la aconsejada por el suministrador de los animales, que de forma consistente ha sido ampliamente utilizada para caracterizar el desarrollo espontáneo de diabetes en la rata ZDF.

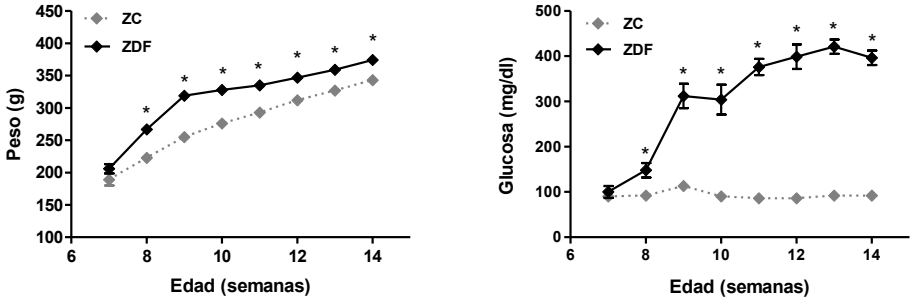


Figura 19. Evolución semanal del peso y los niveles de glucosa en sangre de las ratas ZC y ZDF desde las 7 hasta las 14 semanas de edad.

Desde las 7 hasta las 14 semanas de edad, se registró semanalmente el peso y el nivel de glucemia en ayunas de todos los animales, con el fin de confirmar el estado diabético de las ratas ZDF. En la Figura 19 se representa la evolución de los niveles de glucosa en sangre y el peso de los animales de este estudio.

Para determinar los niveles de glucosa circulantes, los animales se mantuvieron en ayunas durante 4 horas y se analizó una muestra de sangre de la vena lateral de la cola con un medidor Glucocard™ Memory 2 (A. Menarini Diagnostics).

2.2 Obtención de las muestras de sangre

A las 14 semanas de edad, los animales fueron anestesiados con una combinación de ketamina y medetomidina a una dosis de 75mg/kg y 0.5mg/kg respectivamente mediante inyección intraperitoneal y sacrificados mediante exanguinación por punción cardíaca. La sangre obtenida se introdujo en tubos de separación de suero (TAPVAL®, Montlab) se incubó a 37ºC para promover la formación del coágulo. Posteriormente se centrifugó a 1.800g a 4ºC durante 15min. El suero aislado se repartió en alícuotas y se almacenó a -80ºC hasta su análisis.

La determinación de los distintos parámetros bioquímicos en suero de colesterol total, colesterol HDL, colesterol LDL, triglicéridos, transaminasa glutamicooxalacética (GOT), transaminasa glutamicopirúvica (GPT), urea, creatinina y proteína total se realizó con un analizador CLIMA MC-15 (RAL) y los reactivos específicos para cada caso siguiendo las instrucciones del fabricante.

2.3 Obtención del tejido adiposo

Tras el sacrificio, se extrajeron los distintos depósitos de tejido adiposo blanco de los animales. El tejido destinado al análisis de la expresión génica fue inmediatamente congelado en nitrógeno líquido y después almacenado a -80ºC hasta su procesamiento. El tejido destinado a la obtención de las ASC se lavó en una solución de tampón fosfato salino estéril y se introdujo en tubos con 5ml de medio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; Life Technologies) suplementado con 100U/ml de penicilina y 100µg/ml de estreptomicina (P-S; Fisher Bioblock) para su transporte hasta la instalación de cultivos celulares donde inmediatamente se inició el proceso de aislamiento de las ASC. A continuación se detalla la localización (Figura 20) y el procedimiento para la obtención de cada uno de los depósitos de grasa.

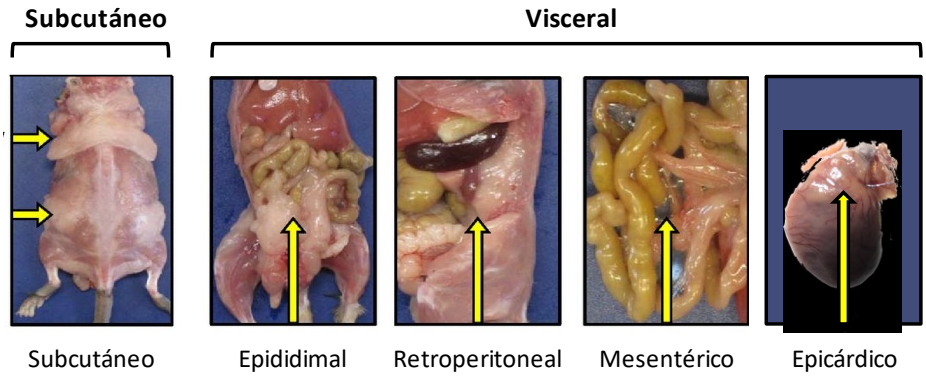


Figura 20. Distribución anatómica de los depósitos de tejido adiposo blanco en la rata. Figura adaptada de Berry D.C. y colaboradores, 2013 [176].

Tejido adiposo subcutáneo

Se realizó un corte longitudinal poco profundo en la piel y con ayuda de unas tijeras quirúrgicas se fue separando la piel del músculo. Se obtuvo el tejido adiposo dispuesto bajo la piel desde la región inguinal hasta la escapular.

Tejido adiposo mesentérico

Se abrió la cavidad abdominal con ayuda de un bisturí y se extrajo el paquete intestinal completo. Se desplegaron los intestinos sobre una superficie estéril y con ayuda de unas tijeras quirúrgicas se extrajo el tejido adiposo desde el estómago hasta el intestino grueso. Se tuvo especial cuidado en extraer los nódulos linfáticos, muy abundantes en este tejido.

Tejido adiposo epididimal

Se extrajo el epidídimo simplemente estirando de él con unas pinzas y se recogió el tejido adiposo dispuesto sobre el mismo.

Tejido adiposo retroperitoneal

Se extrajeron los riñones y se separó el tejido adiposo que los rodea, evitando las glándulas suprarrenales.

Tejido adiposo epicárdico

Se abrió la cavidad torácica y se retiró por completo el pericardio. Se extrajo el corazón y se diseccionó la grasa adherida al miocardio, que se encontraba en la región interatrial, extendiéndose hacia el arco aórtico.

3. MUESTRAS DE PACIENTES

A lo largo de la duración de esta tesis, se recogieron muestras de tejido adiposo perivascular coronario de pacientes sometidos a un trasplante de corazón en el Hospital de la Santa Creu i Sant Pau de Barcelona. El protocolo fue aprobado por el Comité Ético de Investigación del hospital de acuerdo a la Declaración de Helsinki[177].

3.1 Obtención del tejido adiposo

Inmediatamente después de la extracción del corazón del paciente, se procedió a la identificación de la arteria coronaria descendente anterior izquierda (LAD, del inglés *Left Anterior Descending*). Para ello, se localizó en la aorta el seno aórtico izquierdo, del cual emerge la arteria coronaria izquierda. Ésta se bifurca en la arterias coronarias LAD (que desciende por el surco interventricular anterior e irriga la cara anterior y lateral del ventrículo izquierdo) y circunfleja izquierda (que rodea el corazón e irriga la cara posterior del ventrículo izquierdo). Se extrajo la LAD y se diseccionó el tejido adiposo perivascular que la envuelve, utilizando en todo momento material quirúrgico estéril (ver Figura 21). El tejido se lavó con PBS estéril y se introdujo en tubos con 5ml de medio DMEM suplementado con 100U/ml de penicilina y 100µg/ml de estreptomicina para su transporte desde quirófano hasta la instalación de cultivos celulares, donde inmediatamente se inició el proceso de aislamiento de las ASC.

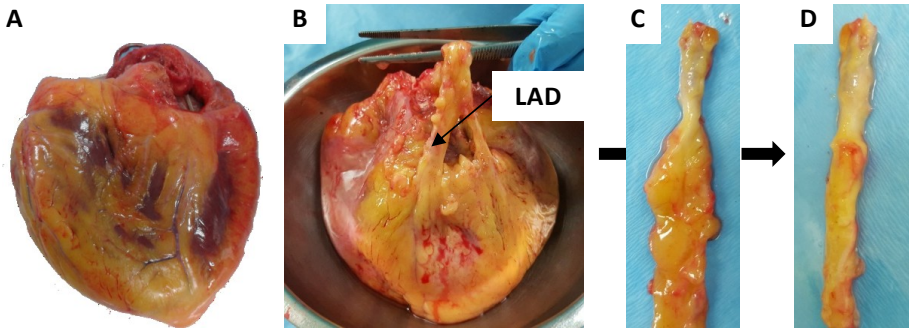


Figura 21. Imágenes de la obtención de tejido adiposo perivascular coronario a partir de corazones explantados de pacientes sometidos a un trasplante de corazón. A) Corazón de un paciente con miocardiopatía isquémica en fase dilatada. B) Localización de la arteria coronaria descendente anterior izquierda (LAD). C) Detalle de coronaria LAD envuelta de tejido adiposo perivascular. D) LAD después de retirar el tejido adiposo perivascular.

3.2 Análisis histológico de las arterias coronarias

Las arterias coronarias se fijaron en paraformaldehido al 4% durante 48 horas, se incluyeron en medio de montaje OCT (del inglés Optimal Cutting Temperature compound, Fisher Scientific) y se guardaron a -80ºC para su posterior procesamiento histológico.

Se realizó una clasificación de las arterias coronarias en función del tipo de lesión aterosclerótica que presentaban siguiendo los criterios establecidos por la *American Heart Association* (AHA)[178]. Para ello se realizaron cortes de 5µm de cada una de ellas y se realizó una tinción con tricrómico de Masson, que como su nombre indica emplea tres colorantes: hematoxilina, fucsina y verde luz.

Protocolo de la tinción con tricrómico de Masson

- Se dejaron secar los cortes a 37ºC durante 15min

- Se fijaron las muestras en Bouin durante 30min y a continuación se realizaron los siguientes pasos:

    - Lavado con agua del grifo
    - Solución Celestin blue 12min
    - Lavado con agua destilada
    - Hematoxilina de Mayer 12min
    - Lavado con agua del grifo
    - Alcohol ácido 1% 2seg
    - Lavado con agua del grifo
    - Fucsina ácida 20min
    - Lavado con agua destilada
    - Ácido fosfomolíbdico 1% 4min
    - Verde luz 4min
    - Lavado con agua destilada
    - Ácido acético 1% 2min
    - Alcohol 90% 2min (2veces)
    - Alcohol 100% 2min (2veces)
    - Histoclear 3min (2 veces)

- Finalmente se cubrieron las muestras con cubreobjetos usando el medio de montaje Histomount (Fisher Scientific).

Con el fin de detectar la presencia de pequeños vasos sanguíneos, marcadores de ASC y la presencia de factor tisular en la adventicia de las arterias coronarias, se realizaron ensayos de inmunofluorescencia.

La tinción de ácidos nucleicos se realizó con Hoechst (#33342, Thermo Fisher), una tinción que emite fluorescencia azul cuando se unen al DNA de doble cadena. Los anticuerpos primarios utilizados están detallados en la Tabla 6. Las imágenes fueron captadas mediante microscopia confocal (Leica TCS SP2).

Protocolo de inmunofluorescencia

- Se dejaron secar los cortes a 37ºC durante 40min
- Se permeabilizaron con PBS - Tween20 0.5% durante 5min
- Se realizó un bloqueo con PBS - albúmina sérica bovina 1% durante 15min (x2)
- Se añadió Signal Enhancer (ThermoFisher)
- Se incubaron las muestras con los anticuerpos primarios durante 1h
- Se incubaron las muestras con los anticuerpos secundarios durante 1h
- Se realizó el montaje con el reactivo Prolong® Gold Antifade (Life Technologies)

Notas:

1. Entre cada paso se realizaron siempre dos lavados con PBS
2. Todas las soluciones se filtraron antes de ser utilizadas
3. Los anticuerpos se centrifugaron durante 10min a 10.000rpm justo antes de su uso para evitar precipitados.

Anticuerpo	Fluorocromo	Dilución	Referencia	Fabricante
α-SMA	FITC	1:200	ab188498	Abcam
TF	-	1:50	4501	Sekisui diagnostics
CD44	FITC	1:100	555478	BD Bioscience
CD45	PE-Cy™5	1:100	555484	BD Bioscience
CD90	FITC	1:250	555595	BD Bioscience

Tabla 6. Anticuerpos primarios utilizados en los ensayos de inmunofluorescencia

4. CULTIVO DE LAS ASC

4.1 Aislamiento

El aislamiento de las ASC se realizó siguiendo una modificación del protocolo previamente descrito por Zuck y colaboradores[116]. Los tiempos de digestión enzimática se optimizaron en función del origen del tejido tal y como se especifica más adelante. En todo momento se trabajó en cabina estéril de flujo laminar vertical en una sala con nivel I de bioseguridad.

Protocolo de aislamiento de las ASC

-El tejido adiposo se colocó en placas de petri con solución PBS en las que se localizaron y eliminaron posibles restos de otros tejidos así como vasos sanguíneos con la ayuda de pinzas y tijeras de microcirugía.

-Se realizaron dos lavados con solución PBS para eliminar restos de sangre del tejido. Una vez limpio, se determinó el peso del tejido y se procedió a su disgregación mecánica mediante un bisturí.

-Se realizó una digestión enzimática con una solución de colagenasa tipo I 1mg/ml (Sigma-Aldrich) en medio DMEM y se incubó a 37ºC en agitación constante durante 30min en las muestras de rata y 1h en las muestras humanas. La actividad enzimática de la colagenasa se inactivó mediante la adición de un volumen de medio DMEM suplementado con un 10% de suero fetal bovino (SFB; Biological Industries).

-La suspensión se centrifugó a 300g durante 10min para obtener la fracción vascular estromal (SVF; del inglés *Stromal Vascular Fraction*). Se descartó el sobrenadante, que contenía los adipocitos en flotación, y se resuspendió el pellet en medio de cultivo (DMEM suplementado con un 10% SFB, 100U/ml de penicilina y 100µg/ml de estreptomicina).

-Se hizo pasar la solución a través de un filtro de 100µm para eliminar fragmentos residuales de tejido.

-La suspensión filtrada se analizó mediante un contador celular Coulter para obtener una estimación del número total de células obtenidas.

-La SVF se sembró en un flascón de 25cm^2 para el cultivo de las ASC o bien se congeló y almacenó a -80ºC para el posterior análisis de la expresión génica.

-El medio de cultivo se reemplazó 24h después para retirar las células no adherentes al plástico.

4.2 Condiciones de cultivo

Todos los cultivos de ASC de rata se cultivaron en condiciones estándar de cultivo, en una incubadora a 37ºC (Nirco) con una atmósfera húmeda, 5% de CO_2 y niveles atmosféricos de O_2 (~20%). Estas condiciones se escogieron por ser las tradicionalmente utilizadas en el cultivo de ASC.

Sin embargo, durante el transcurso de esta tesis surgieron discrepancias en cuanto al uso de una concentración del 20% de oxígeno en el cultivo de las ASC. A pesar de que tradicionalmente se ha cultivado las células en esas condiciones, muy pocas células están expuestas a esos niveles de oxígeno en una situación fisiológica. La mayoría de órganos funcionan a niveles de oxígeno comprendidos entre un 1 y un 12%[179,180]. Además, coincidiendo con los resultados de numerosos grupos, hemos demostrado recientemente efectos positivos del cultivo en bajas concentraciones de oxígeno sobre la proliferación, la secreción de factores paracrinos, la capacidad de migración y el potencial angiogénico de las células madre mesenquimales[181–183]. Por este motivo, cuando se inició el aislamiento de ASC humanas, se decidió implantar un nuevo método de cultivo, manteniendo las células a niveles de oxígeno del 1%.

Por tanto, las ASC humanas se cultivaron en una estación de hipoxia (Whitley H35 Hypoxistation; Nirco) a un 1% de O_2, 5% de CO_2 y 94% de N_2, con una humedad del 75%. Las células se mantuvieron en niveles de subconfluencia previamente a todos los experimentos, que se realizaron entre pase 3 y 4 en todos los casos.

4.3 Obtención del medio condicionado

El medio condicionado (medio que contiene las moléculas secretadas por las ASC) se utilizó para estudiar el efecto paracrino de las ASC sobre la función angiogénica de las células HUVEC.

El medio condicionado se preparó siempre a partir de ASC en pase 3. Una vez alcanzado el 80% de confluencia celular se realizaron dos lavados con PBS y se

añadió medio de cultivo sin suero. A las 48 horas se recogió el medio y se centrifugó a 300g durante 10min para eliminar restos celulares. El medio se almacenó a -80ºC hasta su utilización.

5. OTROS TIPOS CELULARES

Con el fin de analizar posibles efectos o interacciones de las ASC sobre tipos celulares involucrados en la formación de vasos sanguíneos se utilizaron células endoteliales humanas de cordón umbilical (HUVEC del inglés *Human Umbilical Vein Endothelial Cells*) y células musculares lisas vasculares humanas (VSMC).

5.1 HUVEC

Las células HUVEC (Advancell) se cultivaron en medio M199 Earle's salt (Life Technologies) suplementado con 20% SFB, 30µg/ml de suplemento para el crecimiento endotelial (ECGS, Sigma Aldrich), 1mM de piruvato (Life Technologies), 2mM de L-glutamina, 100µg/ml de heparina (Sigma Aldrich) y los antibióticos penicilina (100 U/ml) y estreptomicina (100µg/ml) (Fisher Bioblock). Estas células se sembraron en placas pretratadas 30min a 37ºC con 10mg/ml de gelatina (BD Bioscience).

5.2 VSMC

Se utilizaron VSMC humanas, obtenidas a partir de arterias coronarias humanas de corazones explantados durante operaciones de trasplante de corazón, llevados a cabo en el Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. La obtención de estas células se realizó siguiendo las técnicas de explante establecidas y estandarizadas por nuestro grupo[184], que habían sido aprobadas por el comité ético del hospital en concordancia con el tratado de Helsinki. Estas células se cultivaron en medio M199 (Life Technologies) suplementado con 20% SFB, 100 U/ml de penicilina, 100µg/ml de estreptomicina y 2mM de L-glutamina. Los ensayos se realizaron con células de pases entre 3 y 6.

6. ENSAYOS DE BIOLOGÍA CELULAR

6.1 Citometría de flujo

La citometría de flujo es un método analítico que permite la medición de múltiples parámetros celulares, como el tamaño, forma, complejidad y cualquier componente celular que pueda ser marcado con un fluorocromo. Esta

técnica se basa en hacer pasar una suspensión de partículas (generalmente células) alineadas y de una en una por delante de un haz de luz láser focalizado. El impacto de cada célula con el rayo de luz produce señales que corresponden a los diferentes parámetros de la célula y que son recogidos por distintos detectores.

Especie	Anticuerpo	Fluorocromo	Referencia	Fabricante
Rata	CD29	FITC	555005	BD Bioscience
	CD44	RPE	MCA643PE	Ab Serotec
	CD45	FITC	554877	BD Bioscience
	CD90	PerCP	557266	BD Bioscience
	Isotipo	FITC	555909	BD Bioscience
	Isotipo	RPE	MCA1209PE	Ab Serotec
	Isotipo	PerCP	550672	BD Bioscience
Humano	CD14	FITC	14F-100T	Immunostep
	CD29	PE	555443	BD Bioscience
	CD34	PC5	A07777	Beckman Coulter
	CD44	FITC	555478	BD Bioscience
	CD45	PE-Cy™5	555484	BD Bioscience
	CD73	FITC	561254	BD Bioscience
	CD90	FITC	555595	BD Bioscience
	CD105	PE	560839	BD Bioscience
	Isotipo	FITC	555748	BD Bioscience
	Isotipo	PE	555749	BD Bioscience
	Isotipo	PC5	A07798	Beckman Coulter
	Isotipo	PE-Cy™5	555750	BD Bioscience

Tabla 7. Anticuerpos utilizados para analizar la presencia de marcadores de células madre mesenquimales en la superficie celular de las ASC y la SVF mediante citometría de flujo.

Esta técnica se utilizó para analizar la expresión de marcadores característicos de célula madre mesenquimal en la superficie celular de las células de la SVF y de las ASC cultivadas a pase 3. Para ello se resuspendieron un mínimo de 200.00 células en tampón de citometría, una solución de PBS con 0.1% de albúmina sérica bovina (Nzytech) y 0.1% de azida sódica (Sigma-Aldrich). Seguidamente se añadieron los anticuerpos y se incubaron las muestras durante 30min a 4ºC protegidas de la luz. En el caso de las muestras de SVF, tras la incubación con anticuerpos se lisaron los eritrocitos de la muestra

añadiendo 500µl de Quicklysis™ (Cytognos) e incubando a temperatura ambiente durante 15min. Finalmente se añadieron 500µl de tampón de citometría y se analizaron las muestras en un citómetro de flujo Coulter Epics XL con el programa Expo 32 ADC XL 4 color (Beckman Coulter). En cada experimento se adquirieron un total de 10.000 eventos y se realizaron controles de isotipo para cada anticuerpo. Los anticuerpos utilizados se detallan en la Tabla 7.

6.2 Viabilidad y proliferación celular

La proliferación de las ASC de rata se valoró mediante el kit MTS CellTiter 96 Aqueous One Solution cell proliferation assay kit (Promega). Se trata de un ensayo colorimétrico que permite la cuantificación de células metabólicamente activas, las cuales son capaces de metabolizar el sustrato MTS (3-[4,5,dimetiltiazol-2-il]-5-[3-carboximetoxi-fenil]-2-[4-sulfofenil]-2H-tetrazolio) en presencia de un intermediario aceptor de electrones (metasulfato de fenazina). La reducción del compuesto MTS resulta en la formación de formazán, un compuesto soluble cuantificable a una longitud de onda de 490nm (Figura 22). La producción de formazán es directamente proporcional al número de células vivas en cultivo.

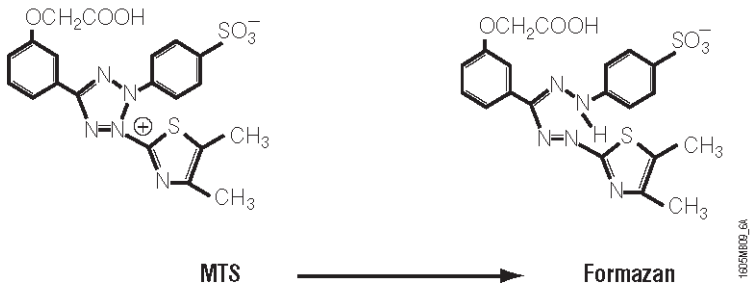


Figura 22. Estructura del sustrato MTS y el producto de su metabolización. Fuente: Promega

Para ello se sembraron por triplicado $5x10^3$ células en una placa de 96 pocillos y se incubaron en las condiciones de cultivo antes descritas durante 24 horas. Se añadieron 10µl de reactivo MTS a cada pocillo y se incubó la placa a 37ºC durante 2h. La cuantificación de la absorvancia a 490nm se realizó en un espectrofotómetro Spectramax 250 con el programa SoftMax (Molecular Devices).

6.3 Cinética de crecimiento celular

La cinética de crecimiento y el tiempo de duplicación celular se analizaron en las ASC de tejido adiposo perivascular coronario. Se sembraron 2 x 10^4 células en placas de 6 pocillos en medio de crecimiento. Cada 2 días se tripsinizaron y se contaron mediante cámara de Neubauer las células de 2 pocillos (duplicado) hasta un total de 10 días. Se relacionó entonces el número de células obtenidas con el número de días de cultivo desde la siembra, para obtener una curva de crecimiento celular. Una vez determinada la fase exponencial de la curva de crecimiento, se calculó el tiempo de duplicación celular (PDT, del inglés *Population Doubling Time*) mediante la fórmula PDT= Te/[(log N2 - log N1)/log2], donde Te es el tiempo (en días) en la fase de crecimiento exponencial, N1 es el número de células al inicio y N2 es el número de células al final de la fase de crecimiento exponencial.

6.4 Diferenciación celular in vitro

Una de las características distintivas de las ASC es su capacidad de diferenciación hacia múltiples linajes celulares, principalmente de origen mesodérmico. En esta tesis se realizaron estudios de diferenciación in vitro tanto para confirmar la identidad de las células obtenidas como para estudiar el impacto de diferentes variables sobre el potencial de diferenciación de las ASC.

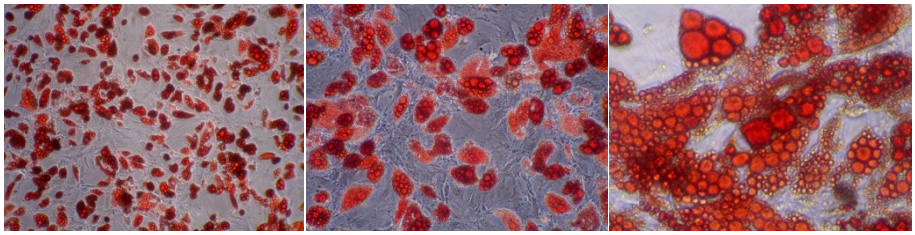
6.4.1 Diferenciación adipogénica

Se sembraron por triplicado las ASC en placas de 6 pocillos a una densidad de $1.5x10^4$ células/cm^2 en medio de crecimiento**.** Dos días después de haber alcanzado un 100% de confluencia se inició el tratamiento con el medio de diferenciación adipogénica descrito en la Tabla 8. El medio se reemplazó tres veces por semana durante 21 días. Al finalizar la diferenciación se obtuvo RNA mensajero (mRNA) y se realizó una tinción de lípidos.

El análisis de la diferenciación celular al linaje adipogénico se realizó mediante la cuantificación de los niveles de expresión de mRNA de genes característicos de adipocitos maduros: *Cd36* (también conocido como *Fat/Cd36*: *Fatty acid translocase*), *Lpl* o *Lipoproteina lipasa* (*Lpl*: *Lipoprotein lipase)* y *Fabp4* o *Proteína de unión a ácidos grasos 4* (*Fabp4: Fatty Acid Binding Protein 4*) mediante PCR a tiempo real (ver apartado 13). Paralelamente se realizó una tinción de lípidos para evaluar la presencia de vacuolas lipídicas mediante el colorante Oil Red O (Sigma-Aldrich).

Protocolo de tinción de lípidos Oil Red O

- Preparar la solución Stock de Oil Red O: 350mg de Oil Red en 100ml de isopropanol. Dejar en agitación durante 24h protegido de la luz
- Inmediatamente antes de realizar la tinción, preparar la solución de trabajo: 60% de la solución stock de Oil Red y 40% de agua destilada.
- Filtrar la solución con papel de filtro y tapar para proteger de la luz (este paso es imprescindible para evitar la formación de precipitados en la tinción)
- Realizar dos lavados con PBS y fijar las células con paraformaldehído al 4% (pH7.4) durante 15min
- Realizar un lavado con isopropanol al 60% durante 1min
- Teñir con solución de trabajo de Oil Red durante 30min
- Realizar un lavado con isopropanol al 60% durante 1min
- Realizar dos lavados con agua destilada
- Observar al microscopio de contraste de fases (Figura 23)



10X **20X** **40X**

Figura 23. Tinción de lípidos Oil Red O. ASC de tejido adiposo subcutáneo de rata después de 21 días de diferenciación adipogénica. Bajo cada imagen se indica el objetivo utilizado.

6.4.2 Diferenciación osteogénica

Se sembraron por triplicado las ASC en placas de 6 pocillos a una densidad de $1.5x10^4$ células/cm^2 en medio de crecimiento**.** Al día siguiente se inició el tratamiento con el medio de diferenciación osteogénica descrito en la Tabla 8. El medio se reemplazó tres veces por semana durante 21 días. Al finalizar la diferenciación se obtuvo mRNA y se realizó una tinción de calcio.

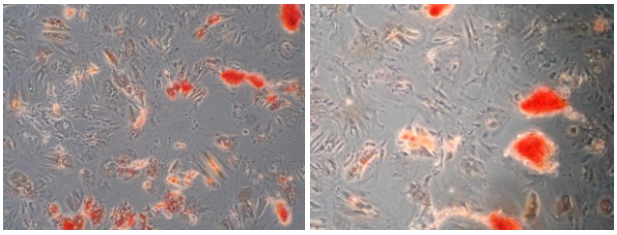
	Diferenciación adipogénica		Diferenciación osteogénica	
Medio Base	DMEM 4.5g/L glucosa + 10% FBS + 1%P/S		DMEM 1g/L glucosa + 10% FBS + 1%P/S	
Cóctel de diferenciación	Dexametasona	1µM	Ácido ascórbico	50 µM
	IBMX	500 µM	β-glicerofosfato sódico	10mM
	Indometacina	100 µM	Dexametasona	100nM
	Insulina	10µg/ml		

Tabla 8. Composición de los medios de diferenciación adipogénica y osteogénica. Todos los reactivos se compraron a Sigma-Aldrich.

El análisis de la diferenciación celular al linaje osteogénico se realizó mediante la cuantificación de los niveles de expresión de mRNA de genes característicos de osteocitos maduros: *Osteopontina* (*Spp1: Secreted Phosphoprotein 1*), *Osteocalcina* (*Bglap: Bone gamma-carboxyglutamate (Gla) protein*) y *Fosfatasa alcalina* (*Alp*: *Alkaline phosphatase*) mediante PCR a tiempo real (ver apartado 13). Paralelamente se realizó una tinción de calcio para evaluar la presencia matriz extracelular calcificada mediante el colorante Alizarin Red (Sigma-Aldrich).

Protocolo de tinción de calcio Alizarin Red

- Preparar la solución de trabajo de Alizarin Red: 2mg de Alizarin Red en 100ml de agua destilada. Dejar en agitación un mínimo de 2 horas protegido de la luz. Filtrar la solución con papel de filtro y tapar para proteger de la luz (este paso es imprescindible para evitar la formación de precipitados en la tinción)
- Realizar dos lavados con PBS y fijar las células con paraformaldehído al 4% (pH7.4) durante 15min
- Realizar un lavado con agua destilada
- Teñir con la solución de Alizarin Red durante 20min
- Realizar tres lavados con agua destilada
- Observar al microscopio de contraste de fases (Figura 24)



10X **20X**

Figura 24. Tinción de calcio Alizarin Red. ASC de tejido adiposo epicárdico de rata después de 21 días de diferenciación osteogénica. Bajo cada figura se indica el objetivo utilizado.

6.4.3 Diferenciación endotelial

La inducción al fenotipo endotelial se realizó mediante el medio de crecimiento comercial para células endoteliales EGM™-2 (Lonza). Este medio está suplementado con SFB, ácido ascórbico, heparina, hidrocortisona, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF; *Vascular Endothelial Growth Factor*), factor de crecimiento fibroblástico (FGF; *Fibroblast Growth Factor*), factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1 (IGF-1: I*nsulin-like Growth Factor 1*), factor de crecimiento epidérmico (EGF: *Epidermal Growth Factor*), gentamicina y anfotericina a concentraciones no especificadas por el fabricante.

Las ASC se sembraron por triplicado en placas de 6 pocillos a una densidad de $1x10^4$ células/cm^2 en medio de crecimiento**.** Al día siguiente se inició el tratamiento con el medio EGM™-2. El medio se reemplazó tres veces por semana durante 14 días. Al finalizar la diferenciación se obtuvo mRNA y se realizó un ensayo de formación de estructuras tubulares en matrigel (ver apartado 6.7).

6.5 Ensayo de migración in vitro

Para analizar la migración de las ASC en cocultivo con las VSMC se utilizaron placas especiales para migración (Culture-Insert µ-Dish 35mm low, Ibidi). Estas placas permiten sembrar dos tipos celulares distintos en una misma placa dejando una separación de 500µm entre ellas, gracias a un inserto de silicona biocompatible que forma dos pocillos rectangulares. Una vez adheridas a la superficie de la placa, se retira el inserto de modo que las células compartan el medio y puedan tanto recibir las señales paracrinas como migrar hacia la otra población celular (Figura 25).

En este ensayo se sembraron 70µl de suspensión celular ($1,8x10^5$ ASC y $2,5x10^5$ VSMC) en cada pocillo. Al día siguiente, se extrajeron los insertos, se realizaron dos lavados con PBS para eliminar restos celulares que hayan podido desprenderse de la placa y se añadieron 500µl de medio fresco. Durante el proceso de migración, se captaron imágenes a las 0, 2, 4, 6, 8 y 10 h, con un microscopio invertido ECLIPSE TS5100 (Nikon) y una cámara Moticam 10 (Motic). El área cubierta por células se analizó utilizando el programa ImageJ.

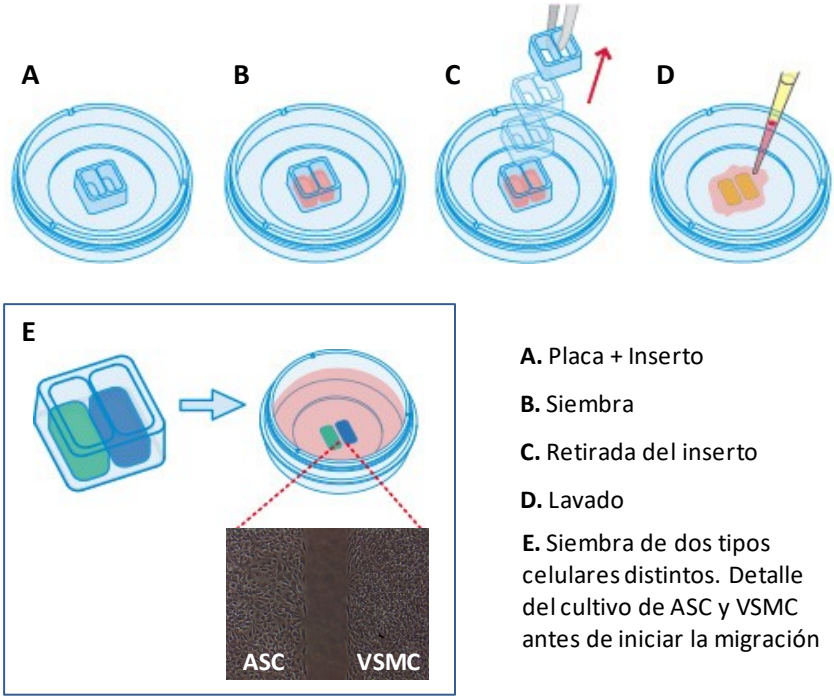


Figura 25. Detalle del procedimiento de siembra en placas Ibidi Culture-Insert. Adaptado de www.ibidi.com

6.6 Tinción de membrana celular en cultivo

Tanto los ensayos de angiogénesis in vitro como los ensayos de migración permitieron analizar la interacción entre las ASC y las VSMC en cocultivo. Para diferenciar los dos tipos celulares se utilizaron tinciones fluorescentes que se intercalan en la membrana celular sin afectar la viabilidad ni la función celular y que por tanto permiten el seguimiento de las células vivas en cultivo[185] mediante microscopia de fluorescencia. En todos los casos las ASC se marcaron con fluorescencia roja (PKH26, Sigma-Aldrich) y las VSMC con fluorescencia

verde (PKH67), con picos de excitación de 551 y 490nm; y picos de emisión de 567 y 502nm respectivamente (Figura 26). El protocolo utilizado se detalla a continuación.

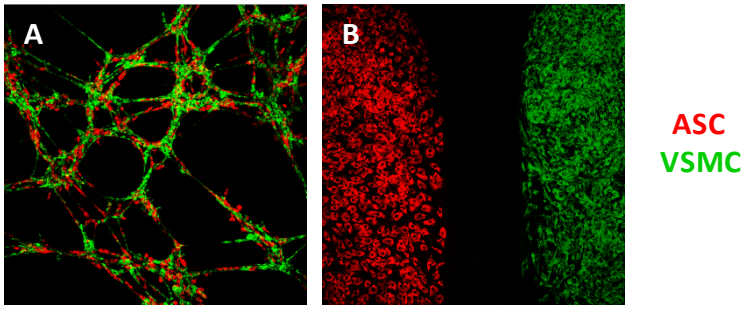


Figura 26. Tinción de células en cultivo. A) Formación de estructuras tubulares en matrigel en un co-cultivo de ASC (rojo) y VSMC (verde). B) Ensayo de migración in vitro de ASC (rojo) y VSMC (verde)

Tinción de membrana celular PKH26/PKH67

- Resuspender $1x10^6$ de células en 5ml de medio de cultivo sin suero

- Centrifugar a 300g durante 10min

- Descartar el sobrenadante y resuspender las células en 500µl del diluyente suministrado con el producto (Diluent C, Sigma-Aldrich)

- Preparar un tubo con 500µl de diluyente y 2µl de colorante (PKH26 o PKH67). Mezclar y añadir al tubo que contiene las células. (Añadir el colorante directamente a las células podría tener un efecto tóxico sobre estas y producir muerte celular)

- Incubar durante 5min a temperatura ambiente, protegido de la luz y agitando con suavidad periódicamente

- Añadir 1ml de SFB e incubar durante 1min (el SFB se une a las moléculas de colorante sobrantes en suspensión)

- Añadir 1ml de medio completo y centrifugar a 300g durante 10min

- Realizar un lavado con 5ml de medio completo y volver a centrifugar a 300g durante 10min

- Descartar el sobrenadante y resuspender las células en el volumen deseado de medio completo

6.7 Angiogénesis in vitro

El ensayo de formación de estructuras tubulares en una matriz tridimensional es un método rápido y cuantificable para evaluar la capacidad de angiogénesis in vitro. Se utilizó este método para evaluar la capacidad angiogénica in vitro de las ASC, solas o en co-cultivo con VSMC y el efecto del secretoma de las ASC sobre la función angiogénica de las HUVEC.

La matriz tridimensional escogida fue Matrigel®, una mezcla comercial que deriva de células de sarcoma de ratón y está compuesto por laminina, colágeno IV, nidógeno/enactina y proteoglicanos, por lo que su composición es similar a la matriz extracelular de muchos tejidos. Se utilizó una composición de matrigel con una menor concentración de factores de crecimiento (Corning® Matrigel® Growth Factor Reduced Basement Membrane Matrix; Corning) ya que la composición del producto original incluye gran cantidad de factores que podrían enmascarar pequeñas diferencias en el potencial angiogénico de las células analizadas.

Para realizar este ensayo se cubrieron las placas con matrigel y se incubaron a 37ºC durante 30min. Seguidamente se sembraron las células y se metieron las placas a la incubadora de CO_2 durante 30min para permitir la adhesión de las células a la matriz. Pasado ese tiempo se añadió el medio correspondiente a cada estudio suplementado con un 10% de matrigel. La formación de tubos se analizó a las 6 horas mediante la captación de imágenes con un microscopio invertido ECLIPSE TS5100 (Nikon) y una cámara Moticam 10 (Motic). Se analizó la longitud de los tubos utilizando el programa ImageJ.

A continuación se muestran dos ejemplos de formación de estructuras tubulares con células ASC y HUVEC (Figura 27).

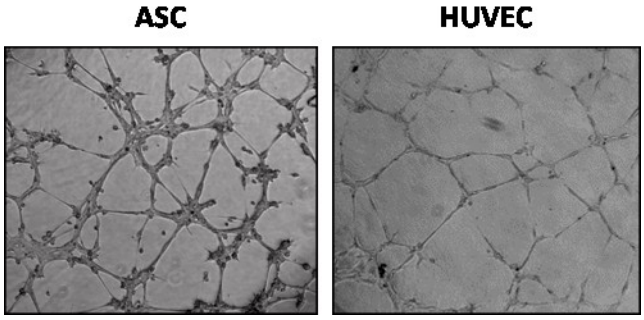


Figura 27. Formación de estructuras tubulares in vitro en una matriz de Matrigel®

7. MODULACIÓN DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN NOTCH

El papel de la vía de señalización Notch en las diferencias funcionales observadas en las ASC se analizó mediante la inhibición y/o activación de la vía mediante el tratamiento con N-[N-(3,5-Difluorofenacetil)-L-alanil]-S-fenilglicina t-butil ester (DAPT, Calbiochem) e isotiocianato de fenetilo (PEITC, Sigma-Aldrich).

7.1 Inhibición de Notch mediante DAPT

DAPT es un inhibidor de gamma-secretasas que impide la escisión del receptor Notch[186]. Cuando la región intracelular de los receptores Notch no se libera, no puede trasladarse al núcleo, donde formaría complejos con otras proteínas nucleares e iniciaría la transcripción de sus genes diana en una situación de activación de la vía de señalización.

En los experimentos de inhibición de la vía de señalización Notch se trataron las células con 50µM de DAPT preparado en dimetilsulfóxido (DMSO) durante 4 días antes del inicio de la diferenciación o de los ensayos de angiogénesis in vivo. Para evaluar el efecto del tratamiento sobre los niveles de activación de la vía de señalización Notch se analizaron los niveles de expresión génica de los genes diana de esta vía (*Hes1, Hes7, Hey1, Hey2* y *HeyL*) y se compararon con los de las células tratadas con vehículo (DMSO).

7.2 Activación de Notch mediante PEITC

PEITC es un compuesto natural que además de tener propiedades quimiopreventivas en cáncer, puede activar la señalización de la vía de Notch al

mismo nivel que la inhibe el compuesto DAPT, en el paso de escisión de los receptores Notch[187].

En los experimentos de activación de la vía de señalización Notch se trataron las células con 5µM de PEITC preparado en DMSO durante 8 horas o 4 días antes del inicio de la diferenciación o de los ensayos de angiogénesis in vivo. Para evaluar el efecto del tratamiento sobre los niveles de activación de la vía de señalización Notch se analizaron los niveles de expresión génica de los genes diana de esta vía (*Hes1, Hes7, Hey1, Hey2* y *HeyL*) y se compararon con los de las células tratadas con vehículo (DMSO).

8. ANGIOGÉNESIS IN VIVO

Con el objetivo de validar los resultados obtenidos *in vitro*, se llevaron a cabo ensayos de angiogénesis in vivo en ratones Balb/c-nu (BALB/cAnNRj-Foxn1^{nu}) suministrados por Janvier Labs (Figura 28). Estos ratones son portadores de una mutación autosómica recesiva en el gen Foxn1 (forkhead box N1) que provoca una aplasia tímica (timo no funcional) que resulta en una reducción importante del número de linfocitos T. Esta inmunodeficiencia resulta muy útil para realizar xenotrasplante (trasplante heterólogo).

Figura 28. Ratón Balb/c-nu. Fuente: Janvier Labs

Se utilizaron ratones macho de 7-8 semanas. Los animales se mantuvieron estabulados en un ambiente controlado a 20.0-22.0ºC, 60 % de humedad relativa y ciclos de día/noche de 12 horas en una sala libre de patógenos específicos (SPF: *Specific Pathogen Free*) y fueron alimentados ad libitum con una dieta comercial estándar (Harlan Iberica SL). La manipulación de los animales y la eliminación de los cadáveres se realizó de acuerdo con los principios y directrices establecidos en la guía *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* publicada por *the United States National Institutes of Health* (NIH Publication No.85-23, revised 2011)[175] y fueron aprobados por el

Comité Ético de Experimentación Animal del Institut Català de Ciències Cardiovasculars.

La matriz de Matrigel utilizada previamente es también de gran utilidad en este tipo de ensayos in vivo, ya que tiene la propiedad de licuarse a una temperatura de 4ºC y polimerizar en un gel sólido a temperatura ambiente.

Para analizar el efecto de las ASC sobre la formación de nuevos vasos sanguíneos se resuspendieron $3x10^6$ células en 500µl de matrigel líquido y se inyectaron en los ratones de forma subcutánea en el lado derecho de la región dorsal. En contacto con el animal, el matrigel solidificó formando una esfera llamada *plug*. Al otro lado del mismo ratón se inyectaron 500µl de matrigel sin células que sirvió como control negativo para cada animal. A los 7 días los ratones se sacrificaron por dislocación cervical y los *plugs* de matrigel se extrajeron y se fotografiaron con un microscopio Zoom 70XL OPTEM acoplado a una cámara Retiga 1300i Fast. Seguidamente se realizó una cuantificación del contenido de hemoglobina de los *plugs* de matrigel o se fijaron en paraformaldehido al 4% para su posterior análisis histológico (ver apartado 8.2).

8.1 Determinación del contenido en hemoglobina

La formación de nuevos vasos sanguíneos se cuantificó mediante la determinación del contenido en hemoglobina en los *plugs* de matrigel mediante el método Drabkin .

Los *plugs* de matrigel se mantuvieron a 4ºC, se disgregaron mecánicamente y tras añadir 250µl de PBS con un 0.1% de Brij-35 (Sigma-Aldrich) se homogeneizaron mediante sonicación. A continuación se centrifugaron a 5000g durante 5min a 4ºC y se recogieron los sobrenadantes. En una placa de 96 pocillos se añadieron 60µl de sobrenadante y 200µl de reactivo Drabkin (Sigma-Aldrich) en cada pocillo, por triplicado. Se incubó durante 5min a temperatura ambiente protegido de la luz, y finalmente se midió la absorbancia a 540nm en un espectrofotómetro Spectramax 250 con el programa SoftMax (Molecular Devices).

El cálculo de la concentración de hemoglobina a partir de los valores de absorbancia se realizó mediante la elaboración de una curva de calibración con

diferentes diluciones de hemoglobina (Sigma-Aldrich) diluida en PBS con un 0.1% de Brij-35.

8.2 Detección de vasos sanguíneos por inmunofluorescencia

La formación de vasos sanguíneos en el interior del matrigel inyectado subcutáneamente en los ratones se observó mediante inmunofluorescencia, con el marcaje de Von Willebrand Factor (VWF), una proteína expresada en el endotelio.

Los *plugs* una vez fijados se incluyeron en OCT y se congelaron a -80ºC. Se realizaron cortes de 10µm en un micrótomo, manteniendo una temperatura inferior a -30ºC.

Siguiendo el protocolo de inmunofluorescencia descrito en el apartado 3.2, se marcaron los núcleos con Hoechst y la proteína (VWF) con el anticuerpo primario policlonal vWF a una dilución 1:50 (Dako). El anticuerpo secundario utlizado fue Alexa Fluor® 488 anti-rabbit (1:100). Las imágenes se captaron mediante microscopia confocal (Leica TCS SP2).

9. TRASPLANTE DE MÉDULA ÓSEA

Los trasplantes de médula ósea nos permitieron analizar el efecto de la presencia de factores de riesgo cardiovascular en el donante sobre el desarrollo de la enfermedad cardiovascular en el receptor. El protocolo utilizado, que se detalla a continuación, consta de 3 etapas: el acondicionamiento de los receptores mediante un tratamiento inmunosupresor, el trasplante de las células de la médula ósea y la recuperación de los parámetros hematológicos post-trasplante.

9.1 Acondicionamiento de los receptores

Los animales recibieron una terapia inmunosupresora combinada consistente en 60mg/Kg de ciclofosfamida (solución de trabajo: 1g Genoxal® Baxter Oncology GmbH disuelto en 50ml de solución salina) por vía intraperitoneal 2 días antes del trasplante y 20mg/Kg de busulfan (Allen Farmacéutica S.A.) el día anterior al trasplante, resuspendidos en 1ml de solución salina y administrados de forma oral mediante una sonda gástrica.

9.2 Extracción de la médula ósea

El día del trasplante, los animales donantes fueron anestesiados con una combinación de ketamina y medetomidina (75mg/kg y 0.5mg/kg, respectivamente) por vía intraperitoneal y posteriormente fueron sacrificados con una sobredosis de pentobarbital sódico (Dolethal, Vetoquinol S.A.) por vía intracardiaca. A continuación se aislaron el fémur y la tibia de ambas patas, se perforaron ambos extremos de los huesos y se extrajo la médula ósea lavando repetidamente con medio DMEM y filtrando la suspensión a través de una malla de 100µm para eliminar los fragmentos de hueso. Esta suspensión se centrifugó 10min a 300g y se añadió medio DMEM para obtener una concentración de $6x10^7$ células nucleadas/ml.

9.3 Trasplante de la médula ósea

El día del trasplante, los receptores previamente inmunosuprimidos fueron anestesiados con una combinación de ketamina y medetomidina (75mg/kg y 0.5mg/kg respectivamente) mediante inyección intraperitoneal y se les administró buprenorfina (0.05mg/kg) como analgésico. Una vez anestesiados, se colocó una vía en la vena lateral de la cola y se inyectaron 0.5ml de suspensión celular ($3x10^7$ células nucleadas) seguido de 0.5ml de solución salina. Los animales trasplantados recibieron tratamiento antibiótico (20mg/kg enrofloxacina cada 24h por vía subcutánea; Ganadexil®, Industrial Veterinaria S.A.) durante 5 días tras el trasplante.

10. DETERMINACIÓN DE LÍPIDOS

El análisis de la acumulación lipídica en hígados de rata se realizó mediante cromatografía en capa fina y cuantificación por densitometría.

10.1 Extracción lipídica

La extracción de los lípidos se llevó a cabo a partir de 5mg de hígado (previamente triturado) utilizando disolventes orgánicos según el método descrito por Bligh y Dyer [188] con algunas modificaciones. Así, se resuspendió el polvo en 1ml de agua y se agitó vigorosamente. Tras ello, se agregaron 3ml de una mezcla diclorometano-metanol (1:2) y se agitó intensamente. A continuación, se agregó 1ml de diclorometano a cada muestra, se agitó intensamente durante 15seg dos veces y se centrifugaron las muestras durante

15min a 1500g. Entonces se recogió la fase orgánica (inferior) con una jeringuilla y se repitió la extracción con la fase acuosa restante agregando 1ml más de diclorometano, agitando y centrifugando nuevamente durante 15min a 1500g. Después, se separó la nueva fase orgánica, se unió a la primera y se dejaron evaporar las muestras bajo una corriente de nitrógeno a 37ºC para evitar la oxidación de los lípidos.

10.2 Cromatografía en capa fina

Los lípidos extraídos se resuspendieron en 100µL de diclorometano, se agitaron intensamente y se cargaron en placas de sílica (DCFertigplatten SIL G-24 UV). Posteriormente, las placas se colocaron en la cubeta de cromatografía y se utilizaron dos fases móviles diferentes, la primera (compuesta por una mezcla heptano:dietiléter:ácido acético; 75:21:4) para separar los lípidos y la segunda (heptano) para arrastrar el frente y los lípidos que no eran de interés, que se dejó correr 4cm por encima de la primera. Una vez secas, las placas se sumergieron en una solución de ácido fosfomolíbidico 5% y ácido sulfúrico 5% en etanol durante 2min, se dejaron secar a temperatura ambiente y se calentaron a 100ºC durante 7min. Los componentes lipídicos se observaron como bandas azules. La densidad de las bandas se analizó con un escáner Chemidoc XRC (BioRad) y se cuantificó con el programa Quantity One (BioRad).

11. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

11.1 Cuantificación de IL-1 beta y TNF αlpha

Las proteínas IL-1β y TNFα son citoquinas liberadas mayoritariamente por células de sistema inmunitario con una función principalmente pro-inflamatoria. Los niveles de estas proteínas se analizaron en hígados de ratas sometidas a trasplante de médula ósea.

Las muestras de hígado (inmediatamente congeladas en nitrógeno líquido y almacenas a -80ºC), se trituraron y se resupendieron en 500µl de tampón de lisis (50mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% deoxicolato de sodio, 0.1% dodecilsulfato de sodio) suplementado con inhibidores de proteasas (complete mini EDTA free protease inhibitor cocktail, Roche). Las muestras se incubaron durante 30min a 4ºC en agitación, seguidamente se homogeneizaron mediante sonicación y se centrifugaron a 10.000g durante 20 min a 4ºC. Las muestras se

analizaron entonces mediante los kits ELISA IL-1 beta Rat y TNF alpha Rat (ab100768 y ab100785 respectivamente, Abcam).

11.2 Cuantificación de la actividad de TF

El factor tisular es una proteína multifuncional ampliamente conocida por su participación como activador de la cascada de coagulación, que también actúa en importantes procesos de señalización. Para averiguar si el factor tisular liberado al sobrenadante por las ASC de los diferentes grupos de pacientes presentaba distinta actividad, ésta se cuantificó mediante el kit ACTICHROME® TF activity assay (Seikisui diagnostics).

11.3 Cuantificación de los niveles de CCL2

CCL2 (del inglés *C-C motif chemokine 2*), también conocida como *Monocyte Chemoattractant Protein 1* (MCP-1), es una proteína soluble secretada al medio extracelular que participa en la vía de señalización del factor tisular, por lo que se cuantificó la cantidad de esta proteína en los sobrenadantes de los cultivos celulares de ASC por medio del kit ELISA Quantikine® Human CCL2/MCP-1 (R&D Systems).

12. SILENCIAMIENTO DE LA EXPRESIÓN DE TF

Con el fin de estudiar el papel del factor tisular en la migración de las ASC y su asociación con las VSMC en la formación de tubos en matrigel, se moduló la expresión génica del FT. El método escogido para manipular la expresión de este gen fue el uso de RNAs de interferencia pequeños, los siRNAs (del inglés: *small interference RNA*). Estos RNA son altamente específicos para la secuencia de nucleótidos de su mRNA diana, y cuando se unen a ella, son reconocidos por un complejo enzimático formado por varias proteínas denominado complejo RISC (del inglés *RNA induced silencing complex*) que realiza repetidos ciclos de degradación específica del mRNA diana y por tanto produce el silenciamiento de la expresión del gen correspondiente[189]. En la mayor parte de los casos, la supresión no es completa, por lo que produce una reducción de la expresión.

El silenciamiento del factor tisular se realizó mediante la tecnología de nucleofección, una técnica basada en la transfección de ácidos nucleicos a células a través de la electroporación de su membrana como consecuencia de aplicar un voltaje específico. Se utilizó el sistema de nucleofección y el kit

Human Mesenchymal Stem Cell (MSC) Nucleofector® (Cultek) y el siRNA TF #S4932 (Applied Biosystems).

En cada experimento de silenciamiento génico se utilizó un control de siRNA aleatorio (#AM4638, Applied Biosystems) para contrastar posibles cambios inespecíficos en el perfil génico o fenotípico de las células debido al uso de esta técnica.

La eficiencia del silenciamiento se comprobó mediante el análisis de los niveles de mRNA de las células transfectadas 24h después de la nucleofección, a través de PCR cuantitativa (ver apartado 13).

13. ANÁLISIS DE LOS NIVELES DE RNA MENSAJERO

13.1 Obtención del RNA celular

El RNA fue obtenido mediante la técnica de extracción RNeasy isolation kit (Qiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante. Esta técnica permite la purificación eficiente del RNA combinando la lisis celular del isotiocianato de guanidina, que desnaturaliza RNasas, con la retención del RNA en una membrana de sílice.

Los cultivos celulares se lavaron dos veces con PBS y se rasparon tras añadir 350µl del reactivo RLT (tampón de lisis que contiene tiocianato de guanidina). Para extraer el RNA de las células de la médula ósea, las muestras fueron centrifugadas 10min a 300g, y tras ser lavadas con PBS, se dividieron en alícuotas de $5x10^6$ células y se añadieron 350µl de RLT. Las muestras de células lisadas en tampón RLT se congelaron a -80ºC hasta el momento de su procesado. El lisado celular se homogeneizó pasando la muestra a través de una aguja de diámetro 20G (0.9mm) en una jeringuilla estéril de plástico de 1ml. Seguidamente se añadió un volumen de etanol al 70%, se mezcló mediante pipeteo y se introdujo en las columnas. Tras realizar varios lavados y centrifugaciones con los reactivos específicos del kit, el RNA, que había quedado retenido en la membrana de las columnas, se eluyó con 30µl de agua libre de RNasas. Una vez aislado el RNA, las muestras se congelaron a -80ºC hasta su análisis.

Las muestras de hígado, obtenidas tras el sacrificio de los animales, se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se congelaron a -80ºC hasta

su uso. Las muestras fueron trituradas manteniendo la muestra congelada en todo momento con nitrógeno líquido. Se agregó 1ml de reactivo de lisis Qiazol (Qiagen) a 25mg de tejido triturado en polvo y se homogeneizó con la pipeta. Seguidamente, se agregaron 200µl de cloroformo a cada muestra, se agitaron vigorosamente durante 15seg y se dejaron reposar durante 3min. Después, se centrifugaron 15min a 12000g a 4ºC y se recogió la fase acuosa (transparente), a la cual se le agregaron 600µl de etanol al 70%. Inmediatamente después de realizar la mezcla, se transfirieron las muestras a las columnas del kit de extracción de RNA y se procedió del mismo modo que en los lisados celulares.

13.2 Cuantificación del RNA

La concentración de RNA se determinó con el espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies), que permite determinar la concentración y pureza del RNA. Los ácidos nucleicos presentan una absorbancia máxima a 260nm, por otro lado, las proteínas tienen un máximo de absorción a 280nm (principalmente por residuos de triptófano). La pureza del RNA se verificó mediante el cociente 260/280 (valor entre 1.8 y 2).

13.3 Síntesis del DNA complementario

El DNA complementario (cDNA) se sintetizó a partir de 1µg de RNA por transcripción reversa, utilizando el kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems). Se utilizaron cebadores de secuencias aleatorias (Random primers) y la enzima Multiscribe™ RT como transcriptasa reversa (Tabla 9).

Reacción de Transcripción Reversa	
Tampón de retrotranscripción 10X	2,0 µl
Mezcla dNTPs 25X (100mM)	0,8 µl
Random Primers 10X	2,0 µl
MultiScribe™ RT	1,0 µl
H_2O libre de RNasas	4,2 µl
RNA	1 µg en 10 µl
TOTAL	**20 µl**

Tabla 9. Reactivos utilizados en la transcripción reversa del RNA

Se utilizó el termociclador GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems) con el programa especificado en la Tabla 10.

	Etapa 1	Etapa 2	Etapa 3	Etapa 4
Temperatura	25ºC	37ºC	85ºC	4ºC
Tiempo	10 min	120 min	5 min	∞

Tabla 10. Programa utilizado en el termociclador para la síntesis de DNA complementario

13.4 PCR a tiempo real

La expresión relativa de mRNA de los genes estudiados fue determinada mediante PCR a tiempo real con el método de TaqMan® Gene Expression Assay (Applied Biosystems), el equipo de detección ABIPRISM 7900HT y el programa SDS 2.4 (Applied Biosystems).

Este método permite medir a tiempo real la amplificación de productos a través de un sistema de dos oligonucleótidos cebadores y una sonda específica para la secuencia diana (TaqMan® assay). La sonda tiene un fluoróforo en su extremo 3' y una molécula inhibidora o *quencher* en el extremo 5' que bloquea la emisión de fluorescencia por su proximidad al extremo 3’ (10 nucleótidos). Esta sonda marcada hibrida específicamente en la parte central del producto de PCR a obtener. De este modo, cuando se efectúa la PCR, la sonda no emite fluorescencia hasta que la polimerasa la encuentra y la hidroliza mediante su actividad exonucleasa 5'-3', lo que provoca la separación del quencher del fluorocromo y la emisión de fluorescencia.

Se utilizaron placas de 384 pocillos, en las que se cargaron duplicados de 10 µl por pocillo de la mezcla detallada en la Tabla 11 para cada muestra y gen analizado.

En todos los procedimientos de PCR a tiempo real, se incluyó una sonda de un gen endógeno control: *GAPDH* (Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa) en las muestras humanas y *Rplp0* (Ribosomal Protein, Large, P0) en las muestras de rata, además de las sondas correspondientes a los genes de estudio, para cuantificar los resultados obtenidos. Generalmente, estos genes control se

expresan de forma constante e independientemente de las condiciones experimentales. El programa de amplificación se detalla en la Tabla 12.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	
TaqMan® Universal PCR Master Mix 2X	10 µl
TaqMan® Assay 20X (Primers 18µM, probe 5 µM)	1 µl
H_2O libre de RNasas	7 µl
cDNA	2 µl
TOTAL	**20 µl**

Tabla 11. Reactivos utilizados en la reacción en cadena de la polimerasa

	Tiempo	**Temperatura (ºC)**	
Activación inicial	5 min	95	
Desnaturalización	15 seg	95	40 ciclos
Alineamiento	30 seg	60	
Elongación	30 seg	72	

Tabla 12. Programa de amplificación utilizado en la reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real

13.5 Cuantificación

El análisis de los niveles de expresión génica se realizó mediante la cuantificación relativa de los niveles de mRNA. Este tipo de cuantificación mide los cambios en el estado basal de un gen de interés respecto a un gen de expresión endógena. Para realizar este análisis, y después de establecer el mismo umbral (o *threshold*) para todas las muestras y genes analizados dentro de cada experimento, se restó el valor de Ct (del inglés *cycle threshold*, cuya traducción es ciclo umbral) del gen endógeno a cada uno de los genes problema (ΔCt). Estos datos se transformaron a $2^{-\Delta Ct}$ para realizar el análisis estadístico.

13.6 PCR Array

Los análisis de la expresión de genes relacionados con la vía de señalización Notch en las ASC y los genes relacionados con el metabolismo de las lipoproteínas en hígado de rata se realizaron mediante los PCR array específicos *Notch Signaling Pathway PCR Array* (PARN-059Z, SA Biosciences) y *Lipoprotein*

Signaling & Cholesterol Metabolism PCR Array (PARN-080A, SA Biosciences), respectivamente. Estos arrays consisten en una placa de 96 pocillos que contiene 84 assays (cebadores y sonda) para genes relacionados con las vías específicas, 5 assays para genes endógenos y 7 pocillos dedicados a controles internos de amplificación de DNA genómico, control de transcripción reversa y control positivo de PCR.

El RNA se obtuvo por el método descrito en el apartado 13.1. La síntesis de cDNA se realizó a partir de 1µg de RNA utilizando el kit RT2 First Strand cDNA synthesis kit (SA Biosciences). Este kit incluye un paso previo de eliminación de DNA genómico en el que se mezcla el RNA con tampón de eliminación de DNA genómico (SABiosciences) en un volumen total de 10µl y se incuba a 42ºC durante 5min. Tras este paso, se preparó la mezcla para la reacción de transcripción reversa (Tabla 13), se incubó a 42ºC durante 15min y se paró la reacción calentando la muestra a 95ºC durante 5min. Seguidamente se añadieron 91µl de H2O libre de RNasas a cada muestra de cDNA (20µl) y se preparó la mezcla detallada en la Tabla 14, de la cual se añadieron 25µl a cada pocillo de la placa.

Reacción de Transcripción Reversa	
BC3 (*RT Buffer 3*) 5X	4 µl
P2 (*Primer and External Control Mix*)	1 µl
RE3 (RT Enzyme Mix 3)	2 µl
H_2O libre de RNasas	3 µl
RNA	10 µl
TOTAL	**20 µl**

Tabla 13. Reactivos utilizados en la transcripción reversa del RNA para el PCR Array

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	
RT^2 SYBR Green Mastermix 2X	1350 µl
H_2O libre de RNasas	1248 µl
cDNA	102 µl
TOTAL	**2700 µl**

Tabla 14. Reactivos utilizados en la reacción en cadena de la polimerasa en el PCR Array

La técnica de detección en los PCR Array utilizados se basa en el fluoróforo SYBR-Green, que se une con gran afinidad al surco menor del DNA bicatenario, aumentando su fluorescencia unas 1000 veces. La detección con SYBR-Green es muy sensible y llega a identificar la producción de una única molécula. Sin embargo, habitualmente este formato de detección necesita una puesta a punto previa para que la PCR no amplifique productos inespecíficos. Para la detección de falsos positivos se realiza al final del programa de amplificación de la PCR una curva de disociación (Tabla 15), que consiste en desnaturalizar las cadenas de DNA y aumentar progresivamente la temperatura para obtener la temperatura de desnaturalización (Tm, del inglés *melting temperature*) que indica que el DNA de doble cadena amplificado se disocia en DNA de cadena sencilla al producirse un pico de fluorescencia. Los picos de la curva de disociación pueden indicar la Tm de la diana o pueden identificar la presencia de amplificaciones no específicas.

		Tiempo	Temperatura (ºC)	
Activación inicial		10 min	95	
Desnaturalización		15 seg	95	40 ciclos
Elongación		1 min	60	
Curva de disociación	Desnaturalización	1 min	95	
	Alineamiento	2 min	65	
	Disociación	2ºC/seg	65 a 95	

Tabla 15. Programa de amplificación utilizado en el PCR Array

13.7 Análisis *in silico* de los datos de expresión génica

Los resultados obtenidos del PCR array específico para la vía de señalización Notch se introdujeron en el paquete informático Partek® Genomics Suite™ (versión 6.5), que permitió analizar los genes diferencialmente expresados entre los dos grupos analizados.

Adicionalmente se utilizó el programa Ingenuity® Pathway Analysis para describir y representar gráficamente la relación entre los genes que presentaron una expresión diferencial y las principales vías de señalización afectadas en los análisis mediante PCR arrays en ASC y en muestras de hígado.

RESULTADOS

ARTÍCULO 1

"Notch signaling pathway activation in normal and hyperglycemic rats differs in the stem cells of visceral and subcutaneous adipose tissue"

Raquel Ferrer-Lorente[1], Maria Teresa Bejar[1], Lina Badimon[1,2]

[1]Cardiovascular Research Center, CSIC-ICCC , Hospital de la Santa Creu i Sant Pau (UAB), Barcelona, Spain.

[2]Cardiovascular Research Chair, UAB, Barcelona, Spain.

Publicado en: Stem Cells and Development. 2014 Dec 15;23(24):3034-48.

Factor de impacto (2014): 3.727

RESUMEN

La activación de la vía de señalización Notch en ratas sanas e hiperglucémicas es distinta en las células madre de tejido adiposo subcutáneo y visceral

Los mecanismos responsables de la diferente función y riesgo cardiometabólico entre los distintos tejidos adiposos blancos siguen siendo desconocidos. El tejido adiposo visceral y el tejido adiposo subcutáneo tienen diferentes funciones metabólicas que parecen ser atribuidas a sus diferentes capacidades intrínsecas de expansión. En este estudio, hemos planteado la hipótesis de que las características del tejido adiposo blanco están determinadas por las células madre residentes derivadas de tejido adiposo (ASC) que se encuentran en los diferentes depósitos de grasa. Por lo tanto, nuestro objetivo ha sido investigar la adipogénesis en depósitos de grasa anatómicamente distintos.

Se caracterizaron las ASC de cinco depósitos de tejido adiposo (subcutáneo, mesentérico, retroperitoneal, epididimal y epicárdico) tanto en ratas delgadas sanas como en ratas obesas y diabéticas. Al realizar la comparación entre los distintos orígenes de las ASC, se encontraron diferencias significativas en la expresión de algunos de los genes que regulan la multipotencia y los primeros pasos de diferenciación adipogénica. Los genes diana de la vía de Notch (las familias de factores de transcripción Hes/Hey) aparecieron regulados a la alta en las ASC derivadas de los depósitos viscerales. Tras la diferenciación adipogénica, la expresión de marcadores de adipocitos maduros fue menor en

las ASC de grasa visceral en comparación con la subcutánea, revelando una menor capacidad adipogénica en las ASC de origen visceral y coincidiendo con una activación diferencial de la vía de señalización Notch. La activación de la vía de Notch (mediante el uso del activador isotiocianato de fenetilo) atenuó la diferenciación adipogénica de las ASC subcutáneas, mientras que la inhibición de Notch mediante DAPT aumentó la diferenciación adipogénica de las ASC de origen visceral.

En conclusión, la activación diferencial de la vía de señalización Notch en las ASC es al menos una de las causas de las diferentes capacidades intrínsecas de expansión de los distintos depósitos de grasa que contribuyen a las variaciones regionales en la homeostasis y a su riesgo cardiometabólico asociado.

STEM CELLS AND DEVELOPMENT
Volume 23, Number 24, 2014
© Mary Ann Liebert, Inc.
DOI: 10.1089/scd.2014.0070

Notch Signaling Pathway Activation in Normal and Hyperglycemic Rats Differs in the Stem Cells of Visceral and Subcutaneous Adipose Tissue

Raquel Ferrer-Lorente,[1] Maria Teresa Bejar,[1] and Lina Badimon[1,2]

The precise mechanisms underlying the differential function and cardiometabolic risk of white adipose tissue (WAT) remain unclear. Visceral adipose tissue (V_{WAT}) and subcutaneous adipose tissue (SC_{WAT}) have different metabolic functions that seem to be ascribed to their different intrinsic expansion capacities. Here we have hypothesized that the WAT characteristics are determined by the resident adipose-derived stem cells (ASCs) found in the different WAT depots. Therefore, our objective has been to investigate adipogenesis in anatomically distinct fat depots. ASCs from five different WAT depots were characterized in both healthy lean and diabetic obese rats, showing significant differences in expression of some of genes governing the *stemness* and the earlier adipogenic differentiation steps. Notch-target genes [*Hes* (hairy and enhancer of split) and *Hey* (hairy/enhancer of split related with YRPW motif) families] were upregulated in ASCs derived from visceral depots. Upon adipogenic differentiation, adipocyte cell markers were downregulated in ASCs from V_{WAT} in comparison to ASCs from SC_{WAT}, revealing a lower adipogenic capacity in ASCs of visceral origin than in those of SC_{WAT} in accordance with the differential activation of Notch signaling. Notch upregulation by its activator phenethyl isothiocyanate attenuated the adipogenic differentiation of ASCs from SC_{WAT} whereas Notch inhibition by N-[N-(3,5-difluorophenacetyl-L-alanyl)]-S-phenylglycine t-butyl ester (DAPT) increased the adipogenic differentiation of ASCs from visceral origin. In conclusion, the differential activation of Notch in ASCs is the origin of the different intrinsic WAT expansion capacities that contribute to the regional variations in WAT homeostasis and to its associated cardiometabolic risk.

Introduction

Obesity is a major risk factor for cardiovascular disease (CVD) and its atherothrombotic complications [1,2]. However, not all excess adiposity shares the same characteristics. Differences in white adipose tissue (WAT) associated to anatomical location have been shown [3]. Subcutaneous adipose tissue (SC_{WAT}) accumulation is a weaker risk factor [4,5], even associated with protection from cardiometabolic disease [6,7], whereas expansion of visceral adipose tissue (V_{WAT}) is closely linked to systemic metabolic alterations [8], being a key contributor to the development of insulin resistance through the increased release of free fatty acids, the development of lipotoxicity, and, subsequently, ectopic fat accumulation [9–11].

The source and conditioning processes responsible for the metabolic differences between SC_{WAT} and V_{WAT} remain unclear. It has been suggested that the proximity of V_{WAT} to the portal vein may allow V_{WAT} to exert more direct metabolic effects on the liver [12]. Other evidences in accordance with the adipose tissue expandability hypothesis [13] support the concept that V_{WAT} and SC_{WAT} have different intrinsic adipose tissue expansion capacities [14]. Understanding differential regulation of resident stem cell differentiation and adipocyte biogenesis and function in anatomically distinct fat depots may be critical to prevent the metabolic comorbidities of visceral obesity.

For many years WAT has been considered as a passive-energy-reserve organ. However, this concept has changed in recent years. WAT is considered a dynamic endocrine organ playing a central role in homeostasis [15]. WAT is also a source of pluripotent cells, adipose-derived stem cells (ASCs), which have been considered an alternative to bone marrow cells for cell-based therapies and tissue engineering [16,17], and have opened new avenues to investigate the mechanisms involved in WAT function.

The generation of mature fat cells from ASCs, or adipogenesis, consists of two related steps: the determination of ASCs into preadipocytes and the differentiation of preadipocytes into mature fat cells [18]. Most of our knowledge

[1]Cardiovascular Research Center, CSIC-ICCC, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau (UAB), Barcelona, Spain.
[2]Cardiovascular Research Chair, UAB, Barcelona, Spain.

about adipogenesis refers to terminal differentiation because most studies have used cell lines that have a restricted potential to differentiate into other cell types [19], limiting the information about the mechanisms that govern earlier differentiation steps and offering little data on depot-specific aspects of differentiation. The molecular pathways implicated in the commitment of stem cells to the adipocyte lineage are incompletely defined. Notch signaling that plays a critical role in controlling stem cell fate, balancing differentiation and proliferation of progenitor cells [20–24], seems to be one of them. Notch activation leads to the maintenance of self-renewal potential through the downregulation of tissue-specific transcription factors and its inhibition induces terminal differentiation in proliferating cells [25,26]. Notch signaling has been shown to be involved in adipocyte differentiation from mesenchymal stem cells (MSCs). However, the precise role of Notch signaling remains controversial [27–36].

Thus, the present study investigates how inherent characteristics of resident ASCs could contribute to the regional variation in fat tissue homeostasis. To achieve this goal, the ASCs from different WAT depots were investigated to identify their *stemness* and their adipogenic differentiation commitment.

Materials and Methods

Animals

Experiments were carried out in male Zucker diabetic fatty (ZDF; $Lepr^{fa/fa}$) rats, and their lean male littermates (ZLC; $Lepr^{fa/+}$ or $Lepr^{+/+}$) obtained from Charles River Laboratories, Inc. All procedures followed in the study fulfilled the criteria of the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* published by the U.S. National Institutes of Health (NIH Publication No. 85–23, revised 1996) and were approved by the Internal Animal Committee Review Board. For further details, see Supplementary Methods (*Animals* heading) (Supplementary Data are available online at www.liebertpub.com/scd).

Serum determinations

Blood was collected in serum-separation tubes, centrifuged, and stored at −80°C to perform further analysis. Biochemical analyses were determined with a CLIMA MC-15 analyzer (RAL). Insulin levels were determined by enzyme immunoassay (Rat insulin EIA kit A05105; Spibio), according to the manufacturer's instructions.

Isolation and culture of ASCs

WATs [epicardial (EC_{WAT}), epididymal (ED_{WAT}), mesenteric (ME_{WAT}), retroperitoneal (RP_{WAT}), and SC_{WAT}] were excised and processed to obtain ASCs as previously described technique [37] and it is detailed in Supplementary Methods (*Isolation and culture of ASCs* heading).

Flow cytometric analysis

Cultured ASCs were characterized by flow cytometry. A detailed description of the protocol and antibodies used is available in Supplementary Methods (*Flow cytometric analysis* heading).

In vitro ASC proliferation assay

Cell proliferation was evaluated by using a nonisotopic immunoassay for the quantification of BrdU incorporation into newly synthesized DNA of actively proliferating cells (Calbiochem® BrdU cell proliferation assay; Calbiochem), according to the manufacturer's instructions. ASCs were plated on 96-well culture plates at a density of 5×10^3 and proliferation was quantified by BrdU uptake 24 h after initial plating.

Gene expression analysis

Total RNA was isolated from ASCs using RNeasy mini isolation kit (Qiagen) according to the manufacturer's protocol. cDNA was synthesized from 1 μg total RNA using High Capacity cDNA Archive kit (Applied Biosystems) and analyzed by real-time polymerase chain reaction (PCR) using TaqMan gene expression assays (Applied Biosystems) and the Applied Biosystems Prism 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems) according to manufacturer's instructions. Relative gene expression values were calculated by the $\Delta\Delta Ct$ method. The raw gene expression values were normalized according to the expression of ribosomal protein, large, P0 (*Rplp0*). TaqMan gene expression assays used are provided in Supplementary Table S1.

Activation of Notch signaling pathway by phenethyl isothiocyanate treatment

ASCs were allowed to reach confluence and pretreated with 5 μM phenethyl isothiocyanate (PEITC; Sigma-Aldrich) prepared in dimethyl sulfoxide (DMSO). An equal volume of DMSO was added to controls. Eight hours or 4 days after treatment, ASCs were induced to differentiate to adipocytes according to the procedure described in Adipogenic differentiation section. After treatment, to assess the response to PEITC, RNA was extracted and the gene expression of the members of Notch pathway was measured. Finally, we evaluated by the gene expression of adipocyte-related markers whether Notch activation via PEITC would induce changes in adipogenic differentiation of ASCs.

Inhibition of Notch signaling pathway by N-[N-(3,5-difluorophenacetyl-L-alanyl)]-S-phenylglycine t-butyl ester treatment

ASCs were allowed to reach confluence and pretreated with 50 μM N-[N-(3,5-difluorophenacetyl-L-alanyl)]-S-phenylglycine t-butyl ester (DAPT, Calbiochem No. 565784; Merk KGaA) for 4 days prior to induction of adipogenic differentiation. ASCs pretreated with DMSO (Sigma-Aldrich) were used as the control group. To assess the response to DAPT treatment, after 4 days, RNA was extracted from treated ASCs, and the expression of the members of Notch pathway was measured. Finally, we evaluated by the gene expression of adipocyte-related markers whether Notch inhibition via DAPT would induce changes in adipogenic differentiation of ASCs.

Adipogenic differentiation

ASCs were seeded at a density of 1.5×10^4 cells/cm^2 and allowed to grow to confluence. Subsequently, cells

were allowed to differentiate for 21 days in the adipogenic medium containing 0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine, 1 μM dexamethasone, 100 μM indomethacin, and 10 μg/mL insulin. All chemicals were obtained from Sigma-Aldrich. Differentiation was evaluated microscopically by Oil Red O staining and lineage-specific gene expression pattern [*Cd36*, CCAAT/enhancer binding protein α (*C/ebpα*), fatty acid binding protein 4 (*Fabp4*), lipoprotein lipase (*Lpl*), and peroxisome proliferator activated receptor γ (*Pparγ*)].

Statistical analyses

All data are presented as mean ± SEM. Statistical analyses were conducted using Student's *t*-test for comparisons of the two groups, and one-way ANOVA with Dunnett's multiple-comparison tests or two-way ANOVA with Bonferroni post-tests analysis. A $P < 0.05$ was considered significant. All statistical analyses were performed using GraphPad Prism software 5 (GraphPad) and Partek Genomics Suite software 6.5 (Partek). Principal component analyses (PCA) were conducted with Partek default settings. PCA procedure was used to represent sample variability, which defines a group of PC, in order to explain the variability existing between the samples.

Results

Metabolic profile

Metabolic profiles of ZDF and ZLC rats are detailed in Supplementary Table S2. ZLC rats showed normal blood glucose levels (92.43 ± 1.99 mg/dL) whereas those of ZDF rats were significantly higher (392.75 ± 11.62 mg/dL, $P < 0.0001$ vs. controls) clearly reflecting their diabetic status. Additionally, insulin levels, total cholesterol, triacylglycerols, urea, and glutamic pyruvic transaminase were significantly higher in ZDF rats than in ZLC animals.

Flow cytometric analysis

Most adherent cells expressed CD29 (over 95%), CD90 (over 93%), and CD44 (over 40%–45%) (Fig. 1) and were negative for hematopoietic marker CD45 (< 0.2%). Different fat depots exhibited a differential profile for CD29 and CD90 markers ($P < 0.01$ and $P < 0.005$, respectively) while no significant differences between fat depots were observed for CD44 and CD45 markers. It is noteworthy that diabetes was associated with a significant reduction of CD29 marker ($P < 0.001$) and that the percentage of $CD29^+$ cells in ED_{WAT} and ME_{WAT} differed from SC_{WAT} in the diabetic group.

ASCs derived from different fat depots exhibit different in vitro proliferation rate

Differences in proliferation rates were observed during in vitro culture of ASCs. Cell proliferation was evaluated by the quantification of BrdU uptake. Results showed that fat depot origin significantly affects ASC proliferation ($P < 0.0001$), whereas no differences between ZLC and ZDF groups were observed. ASCs derived from ME_{WAT} and EC_{WAT} showed a lower proliferation than ASCs derived from SC_{WAT} in both ZLC and ZDF groups (Fig. 2).

Gene expression profiles and regional variation in fat tissue homeostasis

Expression profiling clearly demonstrated significant differences in gene expression between SC_{WAT} and V_{WATs} in both ZLC and ZDF. PCA showed that the SC_{WAT} transcriptome differed greatly from each other visceral depots in both groups, while EC_{WAT}, ED_{WAT}, ME_{WAT}, and RP_{WAT} depots remained closer (Fig. 3).

The gene expression analysis of ASCs for typical panel of surface antigens confirms the mesenchymal stem nature of the cell populations (Table 1). The expression of MSC-specific markers showed significant differences between fat depots for *Cd29*, *Cd73*, *Cd90*, *Cd105*, and *Cd166* in the ZLC group and *Cd29*, *Cd105*, and *Col1a1* in ZDF.

The analysis for genes that define the *stemness* of ASCs and that maintain their pluripotency and self-renewal characteristics showed a differential expression between fat depots, highlighting that most of the genes analyzed were downregulated in ASCs derived from SC_{WAT} compared with V_{WATs} in both the ZLC and ZDF groups (Table 1). These changes reached significance for fibroblast growth factor 2 (*Fgf2*), podocalyxin-like protein 1 (*Podxl*), SRY (sex determining region Y) box 2 (*Sox2*), and telomerase reverse transcriptase (*Tert*) in ZLC and DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 3β (*Dnmt3β*), *Fgf2*, *Podxl*, POU domain class 5 transcription factor 1 (*Pou5f1*), and *Tert* in ZDF rats.

The analysis performed on Notch signaling pathway revealed that ASCs derived from visceral depots were associated with an overall higher expression of the members of this pathway compared with ASCs derived of SC_{WAT}. ASCs derived from ZLC and ZDF rats showed the same pattern (Fig. 4). We observed significant differences between WATs in four Notch receptors. As such there was increase in ASCs from V_{WATs} in the expression of *Notch1* (ZLC: $P < 0.002$; ZDF: $P < 0.0005$), *Notch2* (ZLC: $P < 0.0005$; ZDF: $P < 0.002$), and *Notch3* (ZLC: $P < 0.001$; ZDF: $P < 0.002$) compared with ASCs from SC_{WAT}. Only *Notch4* showed a downregulation in visceral depots *versus* SC_{WAT} (ZLC: $P < 0.05$; ZDF: $P < 0.05$). The analysis of Notch ligands showed a differential expression between WATs and an overexpression of *Delta-like* (*Dll*) *3* (ZLC: $P < 0.0002$; ZDF: $P < 0.001$) and *Jagged 1* (*Jag1*) (ZLC: $P < 0.0001$; ZDF: $P < 0.0005$) in ASCs derived from V_{WATs} compared with SC_{WAT}. However, the expression of *Dll1* exhibited a reduction in ASCs derived from visceral depots compared with SC_{WAT}, only reaching significance in the ZLC group ($P < 0.0001$). Expression levels of *Dll4* were not detected. Finally, these changes were associated with a widespread upregulation of downstream targets of the Notch signaling in all ASCs derived of V_{WATs} compared with ASCs derived from SC_{WAT}. We observed significant differences between adipose depots for the transcription factors *Hes7* (hairy and enhancer of split) (ZLC: $P < 0.0001$; ZDF: $P < 0.0001$), *Hey1* (hairy/enhancer of split related with YRPW motif) (ZLC: $P < 0.0001$; ZDF: $P < 0.005$), *Hey2* (ZLC: $P < 0.005$; ZDF: $P < 0.01$), and *HeyL* (ZLC: $P < 0.0001$; ZDF: $P < 0.005$). *Hes1* expression

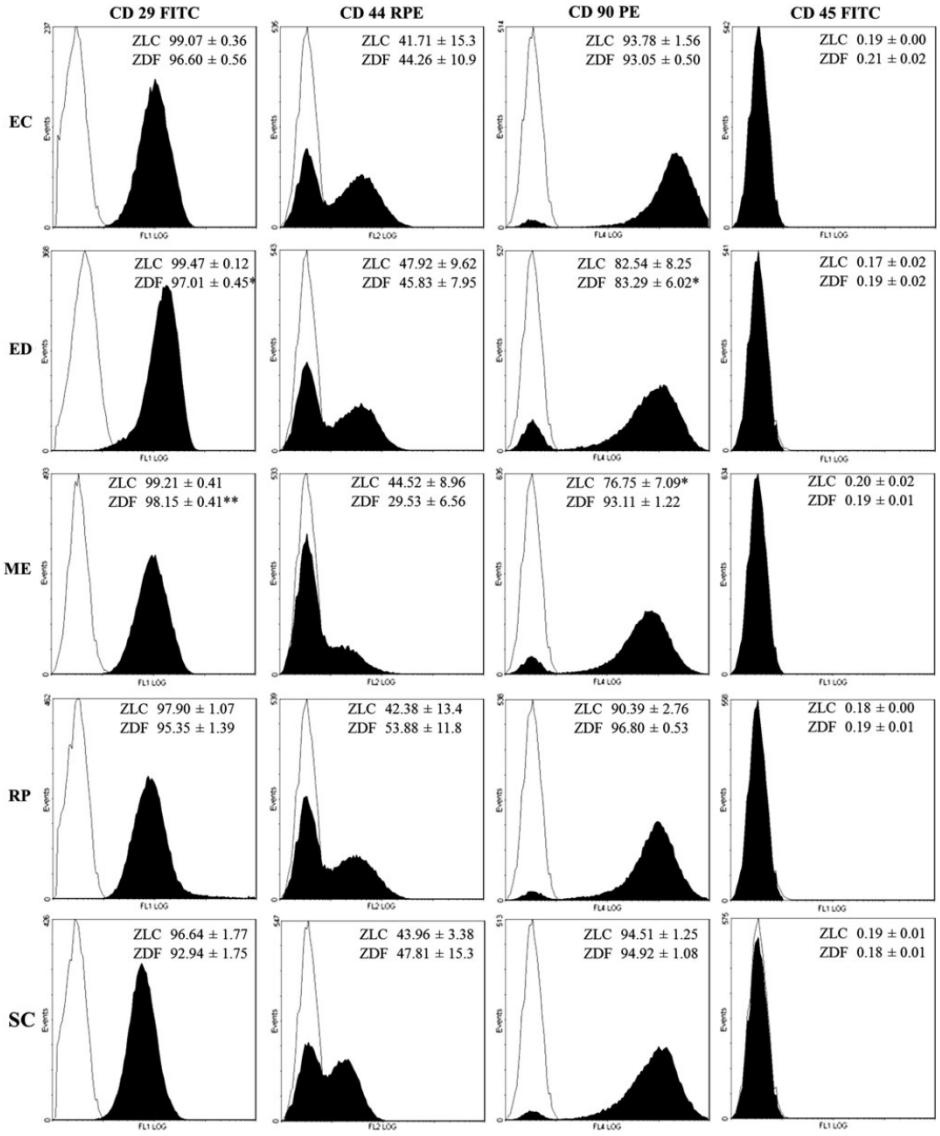


FIG. 1. Phenotypic characterization by flow cytometric analysis. Surface markers were analyzed in adipose-derived stem cells (ASCs) after three passages. The data (*filled histograms*) are the mean ± SEM ($n = 4$–5 per group). $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$ versus subcutaneous adipose tissue (SC_{WAT}) (one-way ANOVA with Dunnett's multiple-comparison tests). Isotype controls were included (*open histograms*).

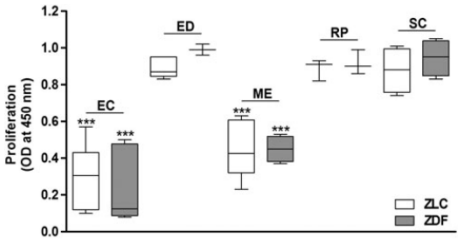


FIG. 2. In vitro ASC proliferation. Cell proliferation was evaluated by using a nonisotopic immunoassay for the quantification of BrdU incorporation into newly synthesized DNA of actively proliferating cells and according to the manufacturer's instructions. BrdU uptake was reported as the mean relative OD_{450}. The data are the mean ± SEM ($n = 3$–4 per group, in technical duplicates). ***$P < 0.001$ versus SC_{WAT}.

showed significant differences only in the diabetic group ($P < 0.0001$).

Differential adipogenic differentiation capacity of ASCs from different fat depots

Differences in adipogenic differentiation potential between ASCs derived from different fat depots were reflected by Oil Red O staining (Figs. 5A and 6A). The microscopic observations were confirmed by expression levels of the adipogenic-specific markers (Figs. 5B and 6B). After 21 days of differentiation induction, all cell types increased the expression of the adipocyte cell markers. However, ASCs derived from SC_{WAT} showed a higher adipocyte cell marker expression (Supplementary Table S3). This pattern was more accentuated in the ASCs derived from diabetic adipose tissues.

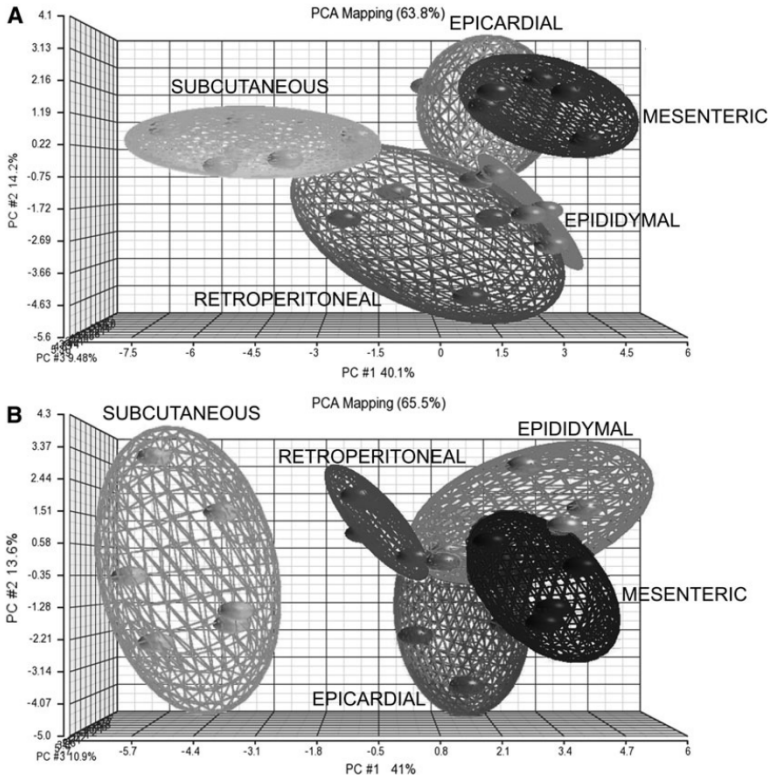


FIG. 3. Principal component analysis (PCA). Gene expression analysis was performed using Partek Genomics Suite software 6.5. PCA results indicated a distinct separation between ASCs derived from different adipose tissue depots. The different individuals are visualized as spheres. Closely related individuals are connected through planes. **(A)** Zucker lean normoglycemic control (ZLC) **(B)** Zucker diabetic fatty (ZDF). ($n = 4$–6, in technical duplicates).

TABLE 1. GENE EXPRESSION PROFILE OF ADIPOSE-DERIVED STEM CELLS DERIVED FROM DIFFERENT FAT DEPOTS

	EC	*ED*	*ME*	*RP*	*SC*
			ZLC		
MSC-specific markers					
Cd29	1.800 ± 0.448[a]	2.250 ± 0.145[b]	2.027 ± 0.289[a]	1.467 ± 0.219	0.603 ± 0.117
Cd44	0.308 ± 0.037	0.316 ± 0.006	0.325 ± 0.046	0.270 ± 0.031	0.328 ± 0.062
Cd73	0.111 ± 0.028[a]	0.163 ± 0.006	0.041 ± 0.007[b]	0.232 ± 0.059	0.249 ± 0.053
Cd90	1.934 ± 0.329	1.679 ± 0.118	2.759 ± 0.140	3.462 ± 0.733	2.458 ± 0.112
Cd105	0.115 ± 0.020	0.138 ± 0.005	0.180 ± 0.028[b]	0.105 ± 0.015	0.074 ± 0.005
Cd166	0.054 ± 0.007	0.099 ± 0.005	0.037 ± 0.009[b]	0.080 ± 0.005	0.075 ± 0.007
Col1a1	1.481 ± 0.259	1.940 ± 0.206	1.412 ± 0.042	2.193 ± 0.207	1.565 ± 0.247
Stemness markers					
Dnmt3b	0.128 ± 0.018	0.153 ± 0.019	0.157 ± 0.013	0.139 ± 0.020	0.102 ± 0.013
Fgf2	1.847 ± 0.296	4.951 ± 0.205[c]	3.526 ± 0.368[c]	3.009 ± 0.592[c]	1.000 ± 0.108
Podxl	0.014 ± 0.002	0.085 ± 0.022[a]	0.161 ± 0.039[c]	0.022 ± 0.005	0.010 ± 0.002
Pou5f1	0.732 ± 0.215	0.682 ± 0.044	0.660 ± 0.135	0.532 ± 0.130	0.593 ± 0.071
Sox2	0.030 ± 0.010[a]	0.031 ± 0.006[a]	0.035 ± 0.004[b]	0.041 ± 0.003[b]	0.011 ± 0.002
Tert	0.169 ± 0.020	0.292 ± 0.040[c]	0.260 ± 0.017[c]	0.262 ± 0.028[c]	0.110 ± 0.011
			ZDF		
MSC-specific markers					
Cd29	1.454 ± 0.132[c]	2.280 ± 0.278[c]	1.704 ± 0.061[c]	1.285 ± 0.079[b]	0.473 ± 0.057
Cd44	0.632 ± 0.240	0.287 ± 0.023	0.273 ± 0.013	0.280 ± 0.013	0.247 ± 0.046
Cd73	0.479 ± 0.184	0.185 ± 0.019	0.084 ± 0.016	0.177 ± 0.015	0.141 ± 0.015
Cd90	1.297 ± 0.121	1.562 ± 0.230	1.977 ± 0.271	2.610 ± 0.154	1.989 ± 0.549
Cd105	0.145 ± 0.036[a]	0.141 ± 0.007[a]	0.170 ± 0.013[b]	0.096 ± 0.006	0.063 ± 0.014
Cd166	0.067 ± 0.008	0.084 ± 0.007	0.052 ± 0.009	0.073 ± 0.007	0.100 ± 0.025
Col1a1	1.161 ± 0.301	2.106 ± 0.209	1.407 ± 0.062	2.450 ± 0.279	1.636 ± 0.275
Stemness markers					
Dnmt3b	0.125 ± 0.005	0.141 ± 0.016	0.153 ± 0.008[a]	0.153 ± 0.013[a]	0.108 ± 0.006
Fgf2	2.681 ± 0.777[a]	4.472 ± 0.488[c]	2.433 ± 0.169[a]	1.970 ± 0.157	0.725 ± 0.132
Podxl	0.010 ± 0.003	0.023 ± 0.002	0.060 ± 0.009[c]	0.015 ± 0.006	0.008 ± 0.001
Pou5f1	0.626 ± 0.143[b]	0.824 ± 0.166	0.567 ± 0.122[b]	0.738 ± 0.074[a]	1.224 ± 0.074
Sox2	0.011 ± 0.004	0.007 ± 0.000	0.015 ± 0.001	0.013 ± 0.002	0.009 ± 0.001
Tert	0.217 ± 0.014[b]	0.284 ± 0.031[c]	0.247 ± 0.019[c]	0.230 ± 0.012[b]	0.121 ± 0.015

Presence of stem-cell-specific markers was analyzed in the ASCs derived from different adipose tissues by real-time PCR. Each data was normalized according to the *Rplp0* expression level and is presented as gene expression levels relative to reference gene. The data are the mean ± SEM ($n = 4$–6, in technical duplicates).

[a]$P < 0.05$, [b]$P < 0.01$, [c]$P < 0.001$ versus subcutaneous (one-way ANOVA with Dunnett's multiple-comparison test).

ASCs, adipose-derived stem cells; *Col1a1*, collagen type α1; *Dnmt3b*, DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 3β; EC, epicardial; ED, epididymal; *Fgf2*, fibroblast growth factor 2; ME, mesenteric; MSCs, mesenchymal stem cells; PCR, polymerase chain reaction; *Podxl*, podocalyxin-like protein 1; *Pou5f1*, POU domain class 5 transcription factor 1; RP, retroperitoneal; SC, subcutaneous; *Sox2*, SRY (sex determining region Y) box 2; *Tert*, telomerase reverse transcriptase; ZDF, Zucker diabetic fatty; ZLC, Zucker lean normoglycemic control.

ASCs derived from ME_{WAT} showed the lower adipogenic potential compared with ASCs derived from SC_{WAT} in ZLC group as well as ZDF group. On the contrary, the adipogenic differentiation capacity of ASCs derived from RP_{WAT} remained closer to SC_{WAT} in both ZLC and ZDF animals.

Notch activation by PEITC attenuates the adipogenic differentiation of ASCs from SC_{WAT} whereas Notch inhibition by DAPT increases the adipogenic differentiation of ASCs from ME_{WAT}

To further confirm the association between the differential activation of Notch system and the differential adipogenic potential observed in ASCs derived from SC_{WAT} and V_{WATs}, ASCs from SC_{WAT} were treated with PEITC, an activator of Notch signaling. PEITC treatment caused a widespread decrease in the level of the expression of the adipocyte cell markers (Fig. 7A) especially at the 4-day time point. Most of the adipogenic markers only showed significant increase in DMSO-treated control compared with undifferentiated cells. Consistent with our hypothesis, these changes were associated with an induction on mRNA levels of the receptor *Notch1* (Fig. 7C) and the downstream gene *Hes1*, at both time points, and the downstream gene *Hes7* at the 8-h time point compared with DMSO-treated control (Fig. 7D). The remaining members of Notch pathway analyzed did not show significant changes. The same treatment was performed on ASCs derived from ME_{WAT} showing resistant to change. No significant changes were observed in the expression of the adipocyte markers nor, consistently, in the Notch pathway components (Supplementary Fig. S1).

On the other hand, ASCs derived from ME_{WAT} were treated with DAPT, an inhibitor of Notch system. DAPT treatment enhanced the adipogenic differentiation capacity of ASCs from ME_{WAT}, showing a marked increase in the mRNA expression of the adipogenic marker compared with undifferentiated ASCs, and significantly different for *Cd36* and *Cebp/α versus* DMSO-treated control (Fig. 8A).

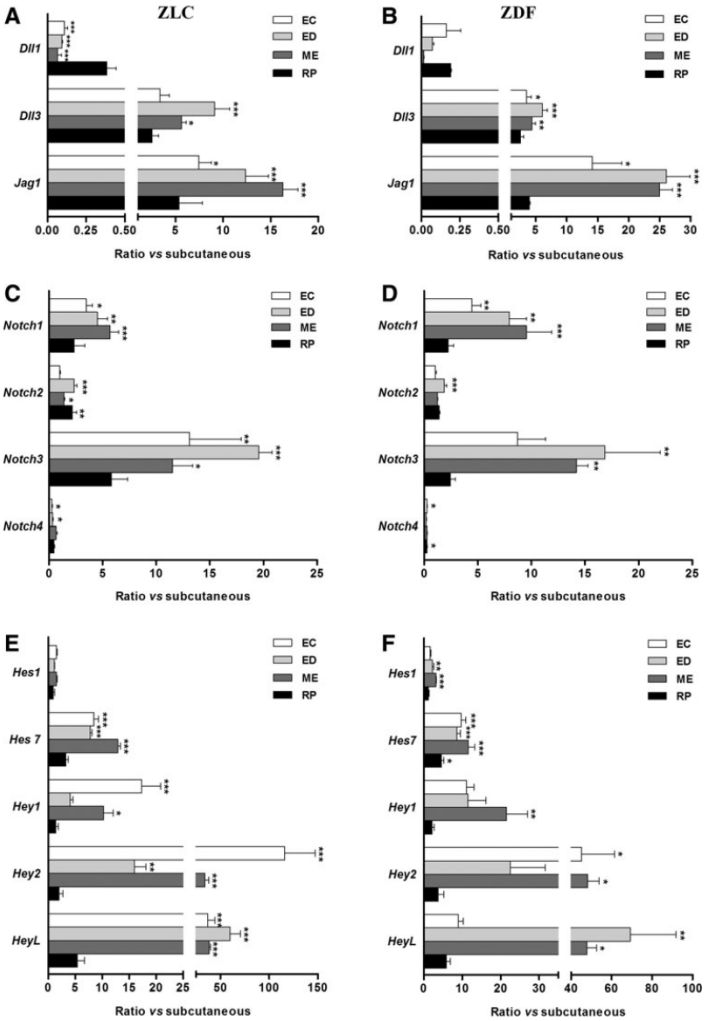


FIG. 4. Differential gene expression profiles of Notch signaling pathway in ASCs derived from different fat depots. Expression of Notch ligands (**A:** ZLC**; B:** ZDF), receptors (**C:** ZLC**; D:** ZDF), and downstream target genes of the Notch signaling (**E:** ZLC**; F:** ZDF) was analyzed in the ASCs derived from different adipose depots by real-time polymerase chain reaction. Each data point was normalized according to *Rplp0* expression levels and is presented as ratio compared with subcutaneous. The data are the mean ± SEM ($n = 4$–6, in technical duplicates). $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$ versus SC_{WAT}.

These changes were associated to the effect on Notch signaling again. Expression of *Dll3* was decreased and *Dll4* was increased significantly upon treatment with DAPT (Fig. 8B), possibly to offset the inhibitory effect on Notch system. ASCs treated with DAPT exhibited significant inhibition of *Notch1*, *Notch3*, and *Notch4* mRNA expression (Fig. 8C) and strong inhibitory effect on transcription levels of all Notch target genes (Fig. 8D). The same treatment was conducted on ASCs derived from SC_{WAT}; however, no change was observed in the adipogenic potential. This lack of response, as expected, was associated with no changes in the Notch signaling pathway (Supplementary Fig. S2).

Discussion

Differences between adipose depots are particularly evident when comparing the association between anatomical localization of WAT and cardiometabolic complications [38]. It is not only the total amount of fat but rather its

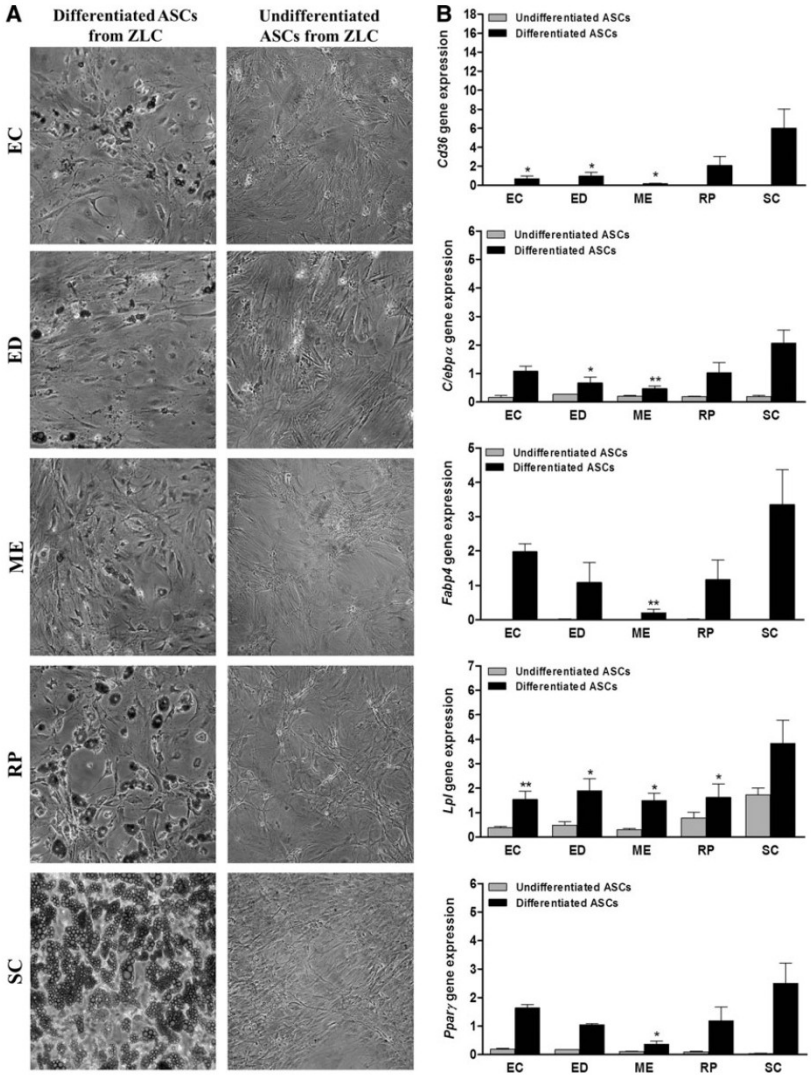


FIG. 5. Adipogenic differentiation potential of ASCs from ZLC rats. ASCs from different adipose tissues were induced to differentiate to adipocytes. Adipogenic differentiation potential was evaluated by Oil Red O staining (20× magnification) **(A)** and by the expression of adipocyte molecular markers **(B)**. Each data point was normalized according to the *Rplp0* expression level and is presented as gene expression levels relative to reference gene. The data are the mean ± SEM ($n = 3$–4, in technical duplicates). $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$ versus SC_{WAT}. No significant differences were observed between visceral adipose tissues (V_{WAT}).

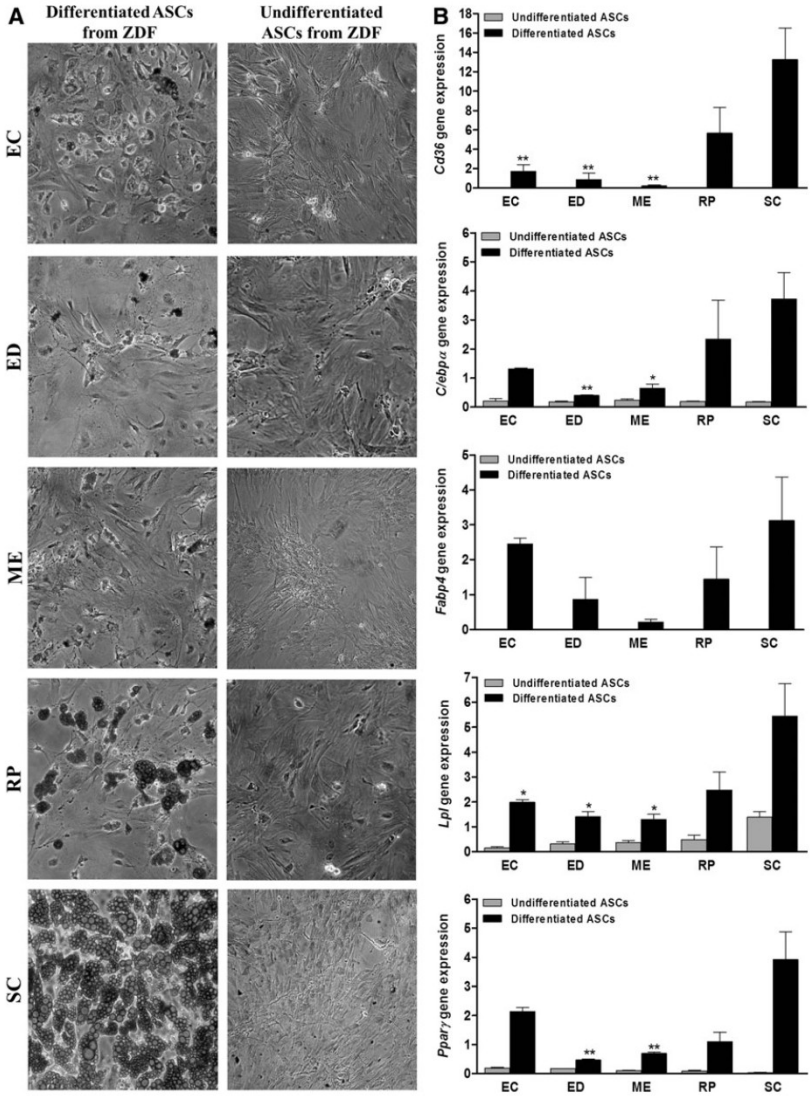


FIG. 6. Adipogenic differentiation potential of ASCs from ZDF rats. ASCs from different adipose tissues were induced to differentiate to adipocytes. Adipogenic differentiation potential was evaluated by Oil Red O staining (20× magnification) **(A)** and by the expression of adipocyte molecular markers **(B)**. Each data point was normalized according to the *Rplp0* expression level and is presented as gene expression levels relative to reference gene. The data are the mean ± SEM ($n = 3$–4, in technical duplicates). $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$ versus SC_{WAT}. No significant differences were observed between V_{WAT}.

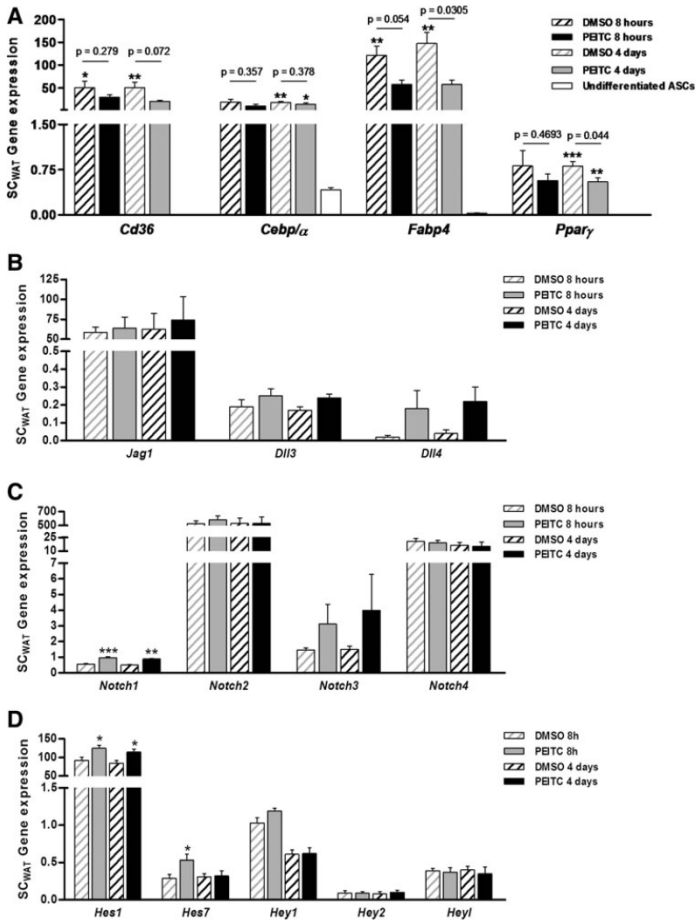


FIG. 7. Notch activation in ASCs from SC_{WAT} by phenethyl isothiocyanate (PEITC). ASCs from SC_{WAT} were pretreated with 5 μM PEITC and induced to differentiate to adipocytes. Adipogenic differentiation potential was evaluated by the gene expression of adipocyte molecular markers **(A)**. $*P<0.05$, $**P<0.01$, $***P<0.001$ versus undifferentiated ASCs. The response to PEITC was assessed by the gene expression of the members of Notch pathway **(B–D)**. $*P<0.05$, $**P<0.01$, $***P<0.001$ versus control [dimethyl sulfoxide (DMSO) treatment]. Each data point was normalized according to the *Rplp0* expression level and is presented as gene expression levels relative to reference gene. The data are the mean ± SEM ($n=3$–4, in technical duplicates).

localization and distribution that increase the risk of CVD. Indeed, visceral fat accumulation is closely linked to metabolic complications, whereas the expansion of subcutaneous fat appears to be metabolically protective [7]. The reason for this differential effect remains unclear. It has been suggested that the different metabolic properties between WATs could be ascribed to intrinsic cell-autonomous differences and their different expansion capacities [14]. Several evidences indicate that subcutaneous depots show enhanced ability to generate adipocytes, which may be protective against metabolic dysfunction, while the hypertrophic response characteristic of visceral depots, and subsequently dysfunctionality, may be maladaptive [39]. But the molecular mechanisms to explain this different adipogenic ability remain unknown.

Adipogenesis includes the determination of multipotent stem cells into preadipocytes and the differentiation of preadipocytes into mature fat cells [18]. Although the process of differentiation has been investigated, little knowledge exists on the determination of stem cells to adipogenic lineage. Clearly a large number of questions regarding how adipogenesis is regulated remain to be answered, and understanding this process will be essential to the prevention and treatment of visceral obesity and its associated comorbidities.

Our study proposes that inherent characteristics of ASCs could contribute to the regional variation in fat tissue homeostasis, and have therefore characterized the ASCs derived from different adipose tissue depots. Immunophenotyping and PCR analysis demonstrate that there are substantial differences between ASCs derived from V_{WAT} and SC_{WAT} in control and diabetic animals, above all between ME_{WAT} and SC_{WAT}. In particular, the higher expression of *Cd29* and *Cd105* in V_{WATs}

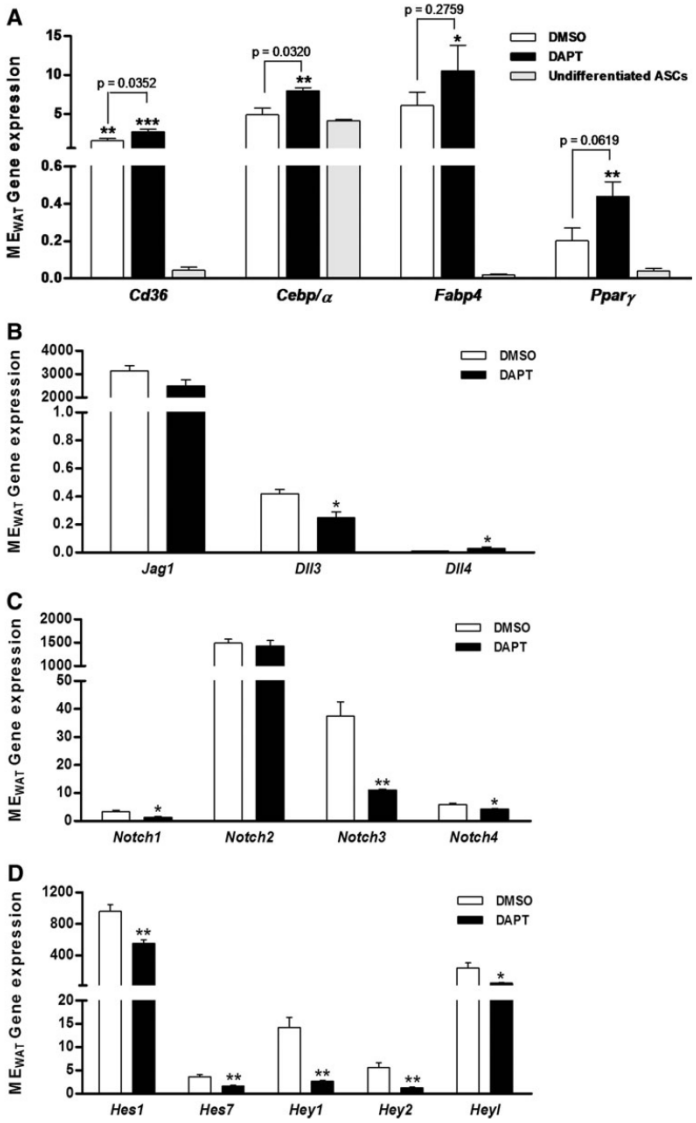


FIG. 8. Notch inhibition in ASCs from V_{WAT} by N-[N-(3,5-difluorophenacetyl-L-alanyl)]-S-phenylglycine t-butyl ester (DAPT). ASCs from mesenteric adipose tissues (ME_{WAT}) were pretreated with 50 μM DAPT and induced to differentiate to adipocytes. Adipogenic differentiation potential was evaluated by the gene expression of adipocyte molecular markers **(A)**. $*P<0.05$, $**P<0.01$, $***P<0.001$ versus undifferentiated ASCs. The response to PEITC was assessed by the gene expression of the members of Notch pathway **(B–D)**. $*P<0.05$, $**P<0.01$ versus control (DMSO treatment). Each data point was normalized according to the *Rplp0* expression level and is presented as gene expression levels relative to reference gene. The data are the mean ± SEM ($n=3$–4, in technical duplicates).

versus SC_{WAT} is noteworthy in both groups. CD29 is a surface marker present in ASCs as well as committed preadipocytes, but CD105 is a marker only present in ASCs and its downregulation enhances adipogenic capacity of ASCs [40]. Moreover, it has been suggested that downregulation of *Cd105* may be a functional requirement for preadipocyte commitment and that the ability to differentiate into adipogenic lineage is restricted to cells not expressing *Cd105* [41]. Therefore, we postulate that the differential expression of *Cd105* between ASCs derived from V_{WATs} and SC_{WAT} may be a hallmark for the adipogenic ability observed between locations.

Expression profiling revealed significant differences between different depots in expression for some of the main molecules governing the *stemness*. In general, the

expression of these molecules was significantly higher in ASCs derived from V_{WATs}, documenting a greater undifferentiated state in ASCs derived from V_{WATs} compared with ASCs derived from SC_{WAT}. Contrary to expectations, the expression of *Pou5f1* was kept lower in ASCs derived from visceral *versus* subcutaneous fats in the diabetic group. This decrease could be in response to the excess energy availability in order to facilitate preadipocyte commitment and to generate new adipocytes. Among all *stemness* markers, only FGF2 has been directly related with adipogenesis. It has been recently reported that FGF2 is a regulator of the earliest stages of the adipogenic process [42]. Therefore, in agreement with a negative role for FGF2 in adipogenesis, the observed overexpression of *Fgf2* in visceral depots may be a key factor in their differential adipogenic capacities.

Several factors have been identified that commit or inhibit the conversion of MSCs to the adipocyte lineage [43–47]. Among these, Notch signaling pathway, which is critical in regulation of self-renewal, proliferation, and differentiation of stem cells [20–24], is included. Notch system has been shown to play a role in adipocyte differentiation [27–36]. However, conflicting findings have been reported concerning its role. Several evidences have demonstrated that inhibition of Notch signaling enhances adipogenesis [28–32], and, on the contrary, other research has shown that its inhibition maintains undifferentiated state of progenitor cells inhibiting its adipocyte differentiation [33–36]. The analysis of the Notch signaling pathway confirmed a higher activation of Notch signaling in ASCs derived from visceral fat depots compared with ASCs derived from SC_{WAT}. Besides the high expression of *Hes1* and *Hey1*, which are known to inhibit adipogenesis by blocking the expression of key transcription factors, such as *Pparγ* and *C/ebpα* [27–29], we observed a marked increase of expression of Notch target genes *Hes7*, *Hey2*, and *HeyL* in V_{WATs} in comparison to SC_{WAT}, which contributes to explain the differences in their adipogenic capacities [14].

In accordance with the expression profiles, significant differences in adipogenic differentiation potential were observed among ASCs derived from different fat depots. Our data suggest that adipocyte cell determination is associated to the level of Notch signaling activation. The visceral WATs show significantly more Notch activation and significantly lower adipogenic capacity, supporting the results of Roldan et al. [47].

Additionally, recent studies showed that Notch signaling is also important in the regulation of stem cell quiescence, an essential property of this cell population [48]. Notch signaling activation is required to maintain the quiescent state, and its inhibition leads to activation, proliferation, and terminal differentiation of stem cells [49,50]. *Notch3*, *Hes1*, *Hey1*, and *HeyL*, which are highly expressed in other type of quiescent stem cells [50–52], showed upregulated in ASCs derived from visceral depots compared with ASCs derived from SC_{WAT}, and consistent with these expression profiles, when the proliferation of ASCs was analyzed by BrdU cell proliferation assay, we observed differences between ASCs derived from different fat depots. Therefore, the upregulation of Notch target genes in ASCs derived from visceral depots might avoid the activation, proliferation, and adipogenic differentiation of these cells, keeping their quiescent state.

Our results suggest that the Notch activation in stem cells controls adipogenesis through *Jag1*, which showed to be highly upregulated in V_{WATs} with respect to SC_{WAT}. The downregulation of *Dll1*, no expression of *Dll4*, and the upregulation of *Dll3*, which might serve exclusively as a cis-inhibiting ligand attenuating signaling induced by other ligands [53], support our hypothesis. Further studies addressed to confirm this hypothesis will be required.

Collectively, our findings support the association between Notch signaling activation and maintenance of quiescent state inhibiting the adipogenic differentiation in ASCs. Therefore, our data pinpoint to a differential activation of Notch system between ASCs derived from SC_{WAT} and V_{WATs}, which would be responsible for their differential adipogenic potential supporting the concept that V_{WATs} and SC_{WAT} have different intrinsic expansion capacities. Finally, in order to confirm the association between the differential activation of Notch system and the differential adipogenic potential, ASCs were treated with PEITC, a Notch activator described as promising cancer chemopreventive agent to date [54], and ASCs were treated with DAPT, a known inhibitor of γ-secretases [29,55]. The present study reveals, for the first time, that PEITC treatment activates Notch signaling in ASCs from SC_{WAT} through the overexpression of *Notch1-Hes1* axis, and that this activation reduces their adipogenic differentiation ability. At the same time, the increase of the adipogenic potential of ASCs of visceral origin, resulting from the suppression of Notch system by DAPT treatment, confirmed the role of Notch signaling pathway in the WAT expansion capacity. The lack of response of ASCs from SC_{WAT} to DAPT and ASCs from ME_{WAT} to PEITC treatment could be the result of the respective inhibition and activation of the Notch system at basal level. Thus, the lack of change in Notch target genes and subsequent adipogenic differentiation allow us to confirm again that the aforementioned changes in the adipogenic potential observed were due to the effect on the Notch signaling pathway.

We observed an expression profile very similar in ZLC and ZDF rats, though ASCs derived from diabetic rats showed a lower activation of the Notch pathway in ASCs derived from V_{WATs} relative to ASCs derived from SC_{WAT}, which would explain the greater adipogenic differentiation capacity associated with ASCs derived from visceral locations in ZDF rats. This greater adipogenic differentiation potential could be in response to the excess energy availability. Therefore, the combination of V_{WATs} expandability through adipocyte hypertrophy and inefficient storing with the severe positive energy balance induced by leptin signal deficiency [56] may result in severe insulin resistance, in spillover of lipid to peripheral tissues,and, consequently, the associated metabolic complications [57]. The higher adipogenic capacity of SC_{WAT} observed in ZDF rats might act as compensatory mechanism, but this is not enough to compensate the inherent lack of V_{WATs} expandability with excess energy availability (Supplementary Fig. S3C).

In summary, the results from this study emphasize the differential role of WAT in accordance to its anatomical localization, and pinpoint to differences in their resident stem cell precursors as responsible for the specific adipose tissue depot development and for the functional differences observed between V_{WATs} and SC_{WAT}. We propose that the

adipose tissue expandability hypothesis is based upon the resident stem cells. ASCs are the ground for the pathophysiological differences observed between visceral and subcutaneous fat depots, both in healthy as well as diabetic conditions. The overexpression of factors, such as *Cd105* and *Fgf2*, and Notch target genes might induce a blockade in the progression into an adipogenic phenotype in ASCs from V_{WATs}. In an adipogenic environment, when increased storage requirements are needed and this blockade is maintained, the inability of V_{WAT} to form new adipocytes would lead to the adipocyte hypertrophy and limited storage capacity, leading to ectopic fat deposition and, ultimately, to the cardiometabolic alterations. Taken together, our findings suggest that the Notch signaling pathway is an important regulator of adipogenesis and cardiometabolic risk. Further studies are required to get information on the role of the specific Notch system components. Notch activation may be a biomarker for predicting cardiovascular risk and a new tentative therapeutic target to promote adipose tissue storage capacity.

Acknowledgments

The authors would like to thank Dr. Javier Crespo for his technical help with flow cytometric analysis and Marta Sanchez for her excellent technical assistance. This work was supported by research grants from the Spanish Ministry of Health-Instituto de Salud Carlos III (RETIC RIC and TERCEL) and the Spanish Ministry of Science and Innovation (PNS SAF2013-42962-R). R.F.L. is a Sara Borrell investigator (Spanish Ministry of Science and Innovation-Instituto de Salud Carlos III) and M.T.B. is granted with a fellowship from the Catalan Government (FI-DGR 2012).

Author Disclosure Statement

No competing financial interests exist.

References

1. Eckel RH and RM Krauss. (1998). American Heart Association call to action: obesity as a major risk factor for coronary heart disease. AHA Nutrition Committee. Circulation 97:2099–2100.
2. Morelli M, M Gaggini, G Daniele, P Marraccini, R Sicari and A Gastaldelli. (2013). Ectopic fat: the true culprit linking obesity and cardiovascular disease? Thromb Haemost 110:651–660.
3. Ibrahim MM. (2010). Subcutaneous and visceral adipose tissue: structural and functional differences. Obes Rev 11: 11–18.
4. Klein S, L Fontana, VL Young, AR Coggan, C Kilo, BW Patterson and BS Mohammed. (2004). Absence of an effect of liposuction on insulin action and risk factors for coronary heart disease. N Engl J Med 350:2549–2557.
5. Fox CS, JM Massaro, U Hoffmann, KM Pou, P Maurovich-Horvat, CY Liu, RS Vasan, JM Murabito, JB Meigs, et al. (2007). Abdominal visceral and subcutaneous adipose tissue compartments: association with metabolic risk factors in the Framingham Heart Study. Circulation 116: 39–48.
6. Snijder MB, M Visser, JM Dekker, BH Goodpaster, TB Harris, SB Kritchevsky, N De Rekeneire, AM Kanaya, AB Newman, FA Tylavsky and JC Seidell. (2005). Low subcutaneous thigh fat is a risk factor for unfavourable glucose and lipids levels, independently of high abdominal fat: the Health ABC Study. Diabetologia 48:301–308.
7. Tran TT, Y Yamamoto, S Gesta and CR Kahn. (2008). Beneficial effects of subcutaneous fat transplantation on metabolism. Cell Metab 7:410–420.
8. Tchernof A and JP Després. (2013). Pathophysiology of human visceral obesity: an update. Physiol Rev 93:359–404.
9. Carey DG, AB Jenkins, LV Campbell, J Freund and DJ Chisholm. (1996). Abdominal fat and insulin resistance in normal and overweight women: direct measurements reveal a strong relationship in subjects at both low and high risk of NIDDM. Diabetes 45:633–638.
10. DeFronzo RA. (2010). Insulin resistance, lipotoxicity, type 2 diabetes and atherosclerosis: the missing links. The Claude Bernar Lecture 2009. Diabetologia 53:1270–1287.
11. Gastaldelli A and G Basta. (2010). Ectopic fat and cardiovascular disease: what is the link? Nutr Metabol Cardiovasc Dis 20:481–490.
12. Kabir M, KJ Catalano, S Ananthnarayan, SP Kim, GW Van Citters, MK Dea and RN Bergman. (2005). Molecular evidence supporting the portal theory: a causative link between visceral adiposity and hepatic insulin resistance. Am J Physiol Endocrinol Metab 288:454–461.
13. Gray SL and A Vidal-Puig. (2007). Adipose tissue expandability in the maintenance of metabolic homeostasis. Nutr Rev 65:7–12.
14. Tchkonia T, YD Tchoukalova, N Giorgadze, T Pirtshalava, I Karagiannides, RA Forse, A Koo, M Stevenson, D Chinnappan, et al. (2005). Abundance of two human preadipocyte subtypes with distinct capacities for replication, adipogenesis, and apoptosis varies among fat depots. Am J Physiol Endocrinol Metab 288:267–277.
15. Ahima RS. (2006). Adipose tissue as an endocrine organ. Obesity 14:242–249.
16. Gimble JM, F Guilak and BA Bunnell. (2010). Clinical and preclinical translation of cell-based therapies using adipose tissue-derived cells. Stem Cell Res Ther 1:19.
17. Mizuno H, M Tobita and AC Uysal. (2012). Adipose-derived stem cells as a novel tool for future regenerative medicine. Stem Cells 30:804–810.
18. Rosen ED and OA MacDougald. (2006). Adipocyte differentiation from the inside out. Nat Rev Mol Cell Biol 7:885–896.
19. Armani A, C Mammi, V Marzolla, M Calachini, A Antelmi, GMC Rosano, A Fabbri and M Caprio. (2010). Cellular models for understanding adipogenesis, adipose dysfunction, and obesity. J Cell Biochem 110:564–572.
20. Lindsell CE, CJ Shawber, J Boulter and G Weinmaster. (1995). Jagged: a mammalian ligand that activates Notch1. Cell 80:909–917.
21. Artavanis-Tsakonas S, MD Rand and RJ Lake. (1999). Notch Signaling: cell fate control and signal integration in development. Science 284:770–776.
22. Chiba S. (2006). Concise review: Notch signaling in stem cell systems. Stem Cells 24:2437–2447.
23. Liu J, C Sato, M Cerletti and A Wagers. (2010). Notch signaling in the regulation of stem cell self-renewal and differentiation. Curr Top Dev Biol 92:367–409.
24. Mutyaba PL, NS Belkin, L Lopas, CF Gray, D Dopkin, KD Hankenson and J Ahn. (2014). Notch Signaling in

mesenchymal stem cells (MSC) harvested from geriatric mice. J Orthop Trauma 8:20–23.
25. Fortini ME and S Artavanis-Tsakonas. (1993). Notch: neurogenesis is only part of the picture. Cell 75:1245–1247.
26. Jones P, G May, L Healy, J Brown, G Hoyne, S Delassus and T Enver. (1998). Stromal expression of Jagged1 promotes colony formation by fetal hematopoietic progenitor cells. Blood 92:1505–1511.
27. Ross DA, PK Rao and T Kadesch. (2004). Dual roles for the notch target gene Hes-1 in the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. Mol Cell Biol 24:3505–3515.
28. Ugarte F, M Ryser, S Thieme, FA Fierro, K Navratiel, M Bornhäuser and S Brenner. (2009). Notch signaling enhances osteogenic differentiation while inhibiting adipogenesis in primary human bone marrow stromal cells. Exp Hematol 37:867–875.
29. Huang Y, X Yang, Y Wu, W Jing, X Cai, W Tang, L Liu, BE Grottkau and Y Lin. (2010). γ-secretase inhibitor induces adipogenesis of adipose-derived stem cells by regulation of Notch and PPAR-γ. Cell Prolif 43:147–156.
30. Urs S, B Turner, Y Tang, B Rostama, D Small and L Liaw. (2012). Effect of soluble Jagged1-mediated inhibition of Notch signaling on proliferation and differentiation of an adipocyte progenitor cell model. Adipocyte 1:46–57.
31. Osathanon T, K Subbalekha, P Sastravaha and P Pavasant. (2012). Notch signalling inhibits the adipogenic differentiation of single-cell-derived mesenchymal stem cell clones isolated from human adipose tissue. Cell Biol Int 36:1161–1170.
32. Lei T, Y Bi, MJ Gao, SM Gao, LL Zhou, HL Zheng and XD Chen. (2013). HES1 inhibits adipogenesis of porcine mesenchymal stem cells via transcriptional repression of FAD24. Domest Anim Endocrinol 45:28–32.
33. Garcés C, MJ Ruiz-Hidalgo, J Font de Moras, C Park, L Miele, J Goldstein, E Bonvini, A Porrás and J Laborda. (1997). Notch-1 controls the expression of fatty acid-activated transcription factors and is required for adipogenesis. J Biol Chem 272: 29729–29734.
34. Jung S, N Song, HS Hwang, JJ An, Y Cho, HY Kweon, S Kang, KG Lee, K Yoon, et al. (2011). Silk peptides inhibit adipocyte differentiation through modulation of the Notch pathway in C3H10T1/2 cells. Nutr Res 31:723–730.
35. Ba K, X Yang, L Wu, X Wei, N Fu, Y Fu, X Cai, Y Yao, Y Ge and Y Lin. (2012). Jagged-1-mediated activation of notch signalling induces adipogenesis of adipose- derived stem cells. Cell Prolif 45:538–544.
36. Lai PY, CB Tsai and MJ Tseng. (2013). Active form Notch4 promotes the proliferation and differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. Biochem Biophys Res Commun 18:1132–1139.
37. Ferrer-Lorente R, MT Bejar, M Tous, G Vilahur and L Badimon. (2014). Systems biology approach to identify alterations in the stem cell reservoir of subcutaneous adipose tissue in a rat model of diabetes: effects on differentiation potential and function. Diabetologia 57:246–256.
38. Lapidus L, C Bengtsson, B Larsson, K Pennert, E Rybo and L Sjöström. (1984). Distribution of adipose tissue and risk of cardiovascular disease and death: a 12-year follow-up of participants in the population study of women in Gothenburg, Sweden. Br Med J 289:1257–1261.
39. Joe AWB, L Yi, Y Even, A Wayne Vogl and FMV Rossi. (2009). Depot-specific differences in adipogenic progenitor abundance and proliferative response to high-fat diet. Stem Cells 27:2563–2570.
40. Cawthorn WP, EL Scheller and OA MacDougald. (2012). Adipose tissue stem cells meet preadipocyte commitment: going back to the future. J Lipid Res 53:227–246.
41. Sengenàs C, K Lolmede, A Zakaroff-Girard, R Busse and A Bouloumie. (2005). Preadipocytes in the human subcutaneous adipose tissue display distinct features from the adult mesenchymal and hematopoietic stem cells. J Cell Physiol 205:114–122.
42. Hutley LJ, FS Newell, YH Kim, X Luo, CH Widberg, W Shurety, JB Prins and JP Whitehead. (2011). A putative role for endogenous FGF-2 in FGF-1 mediated differentiation of human preadipocytes. Mol Cell Endocrinol 339: 165–171.
43. Bowers RR, JW Kim, TC Otto and MD Lane. (2006). Stable stem cell commitment to the adypocyte lineage by inhibition of DNA methylation: role of the BMP-4 gene. Proc Natl Acad Sci U S A 130:13022–13027.
44. Bowers RR and MD Lane. (2008). Wnt signaling and adipocyte lineage commitment. Cell Cycle 7:1191–1196.
45. Spinella-Jaegle S, G Rawadi, S Kawai, S Gallea, C Faucheu, P Mollat, B Courtois, B Bergand, V Ramez, et al. (2001). Sonic hedgehog increases the commitment of pluripotent mesenchymal cells into the osteoblastic lineage and abolishes adipocytic differentiation. J Cell Sci 114: 2085–2094.
46. Tang QQ and MD Lane. (2012). Adipogenesis: from stem cell to adipocyte. Annu Rev Biochem 81:715–736.
47. Roldan M, M Macias-Gonzalez, R Garcia, FJ Tinahones and M Martin. (2011). Obesity short-circuits stemness gene network in human adipose multipotent stem cells. FASEB J 25:4111–4126.
48. Orford KW and DT Scadden. (2008). Deconstructing stem cell self-renewal: genetic insights into cell-cycle regulation. Nat Rev Genet 9:115–128.
49. Chapouton P, P Skupien, B Hesl, M Coolen, JC Moore, R Madelaine, E Kremmer, T Faus-Kessler, P Blader, ND Lawson and L Bally-Cuif. (2010). Notch activity levels control the balance between quiescence and recruitment of adult neural stem cells. J Neurosci 30:7961–7974.
50. Bjornson CRR, TH Cheung, L Liu, PV Tripathi, KM Steeper and TA Rando. (2012). Notch signaling is necessary to maintain quiescence in adult muscle stem cells. Stem Cells 30:232–242.
51. Fukada S, A Uezumi, M Ikemoto, S Masuda, M Segawa, N Tanimura, H Yamamoto, Y Miyagoe-Suzuki and S Takeda. (2007). Molecular signature of quiescent satellite cells in adult skeletal muscle. Stem Cells 25:2448–2459.
52. Kitamoto T and K Hanaoka. (2010). Notch3 null mutation in mice causes muscle hyperplasia by repetitive muscle regeneration. Stem Cells 28:2205–2216.
53. Ladi E, JT Nichols, W Ge, A Miyamoto, C Yao, L Yang, J Boulter, YE Sun, C Kintner and G Weinmaster. (2005). The divergent DSL ligand Dll3 does not activate Notch signaling but cell autonomously attenuates signaling induced by other DSL ligands. J Cell Biol 170:983–992.
54. Kim SH, A Sehrawat, K Sakao, ER Hahm and SV Singh. (2011). Notch activation by phenethyl isothiocyanate attenuates its inhibitory effect on prostate cancer cell migration. PLoS One 6:e26615.
55. Wang T, N You, K Tao, X Wang, G Zhao, N Xia, N Li, L Tang, W Liu and K Dou. (2012). Notch is the key factor in the process of fetal liver stem/progenitor cells differ-

entiation into hepatocytes. Dev Growth Differ 54:605–617.
56. Gray SL, E Dalla Nora, J Grosse, M Manieri, T Stoeger, G Medina-Gomez, K Burling, S Wattler, A Russ, et al. (2006). Leptin deficiency unmasks the deleterious effects of impaired peroxisome proliferator activated receptor γ function (P465L PPARγ) in mice. Diabetes 55:2669–2677.
57. Hernández Vera R, G Vilahur, R Ferrer-Lorente, E Peña and L Badimon. (2012). Platelets derived from the bone marrow of diabetic animals show dysregulated endoplasmic reticulum stress proteins that contribute to increased thrombosis. Arterioscler Thromb Vasc Biol 32:2141–2148.

Address correspondence to:
Prof. Lina Badimon
Cardiovascular Research Center
CSIC-ICCC
Hospital de la Santa Creu i Sant Pau (UAB)
C/Sant Antoni Maria Claret 167
Barcelona 08025
Spain

E-mail: lbadimon@csic-iccc.org

Received for publication February 4, 2014
Accepted after revision July 11, 2014
Prepublished on Liebert Instant Online July 18, 2014

Supplementary Data

Supplementary Methods

Animals

Seven-week-old male Zucker diabetic fatty (ZDF; $Lepr^{fa/fa}$) rats, a genetic model of metabolic syndrome [1], and age-matched Zucker lean normoglycemic control rats (ZLC; $Lepr^{fa/+}$ or $Lepr^{+/+}$) were purchased from Charles River Laboratories, Inc. The rats were maintained in a controlled environment (20.0°C–22.0°C, 60% relative humidity, and light on from 07:00 to 19:00) and were fed with LabDiet®5008 chow (Panlab) ad libitum. Rat weights and blood glucose levels were recorded weekly in all animals (Supplementary Fig. S3A, S3B). Food intake was recorded daily (Supplementary Fig. S3C). ZDF rats showed increased blood glucose levels > 300 mg/dL from 11-week old. Fourteen-week-old rats were anesthetized with a combination of ketamine and medetomidine (75 mg/kg and 0.5 mg/kg; i.p.), and then killed by exsanguinations. White adipose tissues (WATs) were dissected immediately after exsanguinations and processed for adipose-derived stem cell (ASC) isolation. All procedures followed in the study fulfilled the criteria of the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* published by the U.S. National Institutes of Health (NIH Publication No. 85-23, revised 1996) and were approved by the Internal Animal Committee Review Board.

Isolation and culture of ASCs

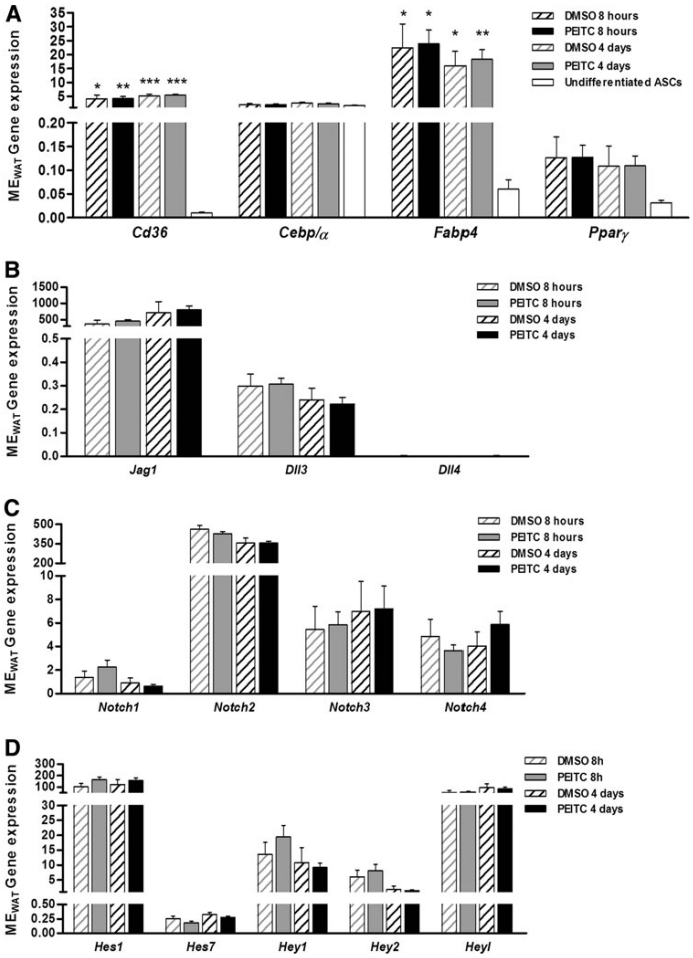
WATs [epicardial (EC_{WAT}), epididymal (ED_{WAT}), mesenteric (ME_{WAT}), retroperitoneal (RP_{WAT}), and subcutaneous (SC_{WAT})] were minced and washed extensively with phosphate-buffered saline (PBS) 1× supplemented with 100 U/mL of penicillin and 100 μg/mL of streptomycin (Gibco, Life Technologies). Immediately, the tissues were digested at 37°C for 30 min with type I collagenase solution (1 mg/mL; Sigma-Aldrich) on a prewarmed orbital shaker. Collagenase activity was neutralized with equal volume of Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Gibco, Life Technologies) supplemented with 10% fetal bovine serum (Biological Industries) and 1% penicillin/streptomycin and centrifuged at 1,200 rpm for 10 min to obtain the stromal vascular fraction (SVF). The SVF was resuspended in the medium described previously and filtered through a 100-μm mesh filter to eliminate remaining tissue fragments. The isolated SVF was counted and plated onto a 25-cm^2 culture flasks. After 24 h, nonadherent cells were removed and the medium was replaced. Adherent cells were referred as ASCs. ASCs were expanded in a humidified environment at 37°C with 5% CO_2 and maintained at subconfluent levels. All analyses were performed at passage 3.

Flow cytometric analysis

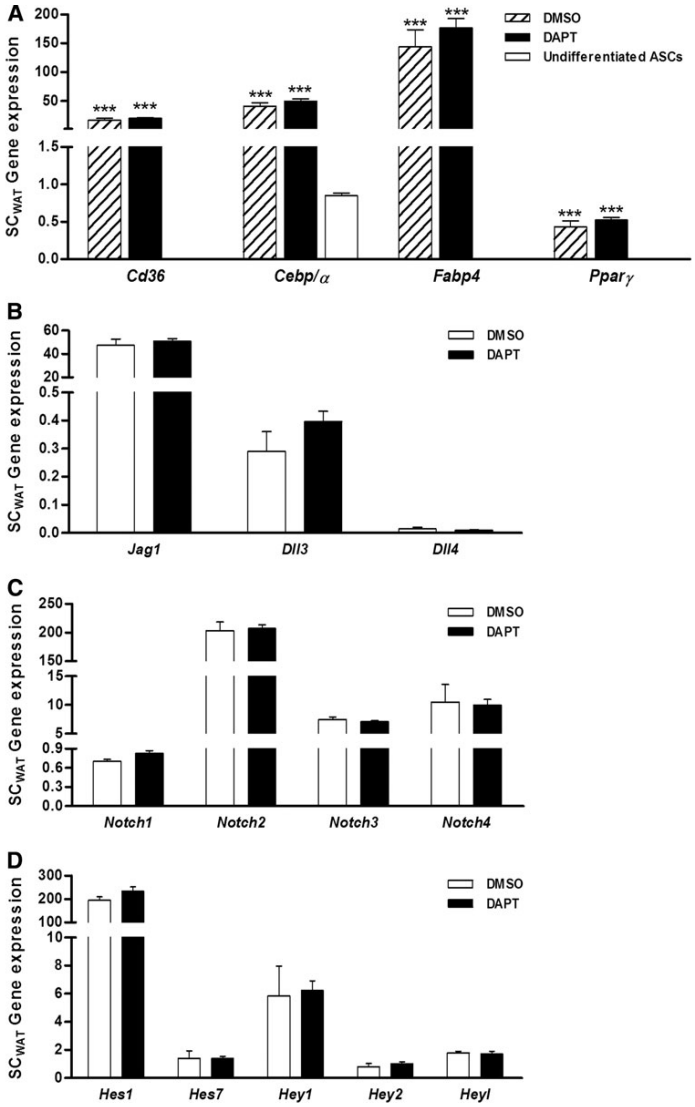
Cultured ASCs were characterized by flow cytometric analysis, as reported previously [2]. Cells were suspended in flow cytometry buffer (FCB; PBS, 2% bovine serum albumin, and 0.1% sodium azide). Cell aliquots (0.5×10^6 cells) were incubated for 30 min at 4°C with PerCP-conjugated monoclonal antibody against CD90 (Clone OX-7; BD Biosciences), R-phycoerythrin-conjugated monoclonal antibody against CD44 (Clone OX-50; AbD Serotec), FITC-conjugated monoclonal antibody against CD29 (Clone Ha2/5; BD Biosciences), and FITC-conjugated monoclonal antibody against CD45 (Clone OX-1; BD Biosciences). Isotype-identical antibodies (BD Biosciences) were used as controls. After two washes with cold FCB, a total of 50,000 events were analyzed by fluorescence-activated cell sorting using a Beckman Coulter Epics XL instrument and Expo 32 ADC XL 4 color software.

Supplementary References

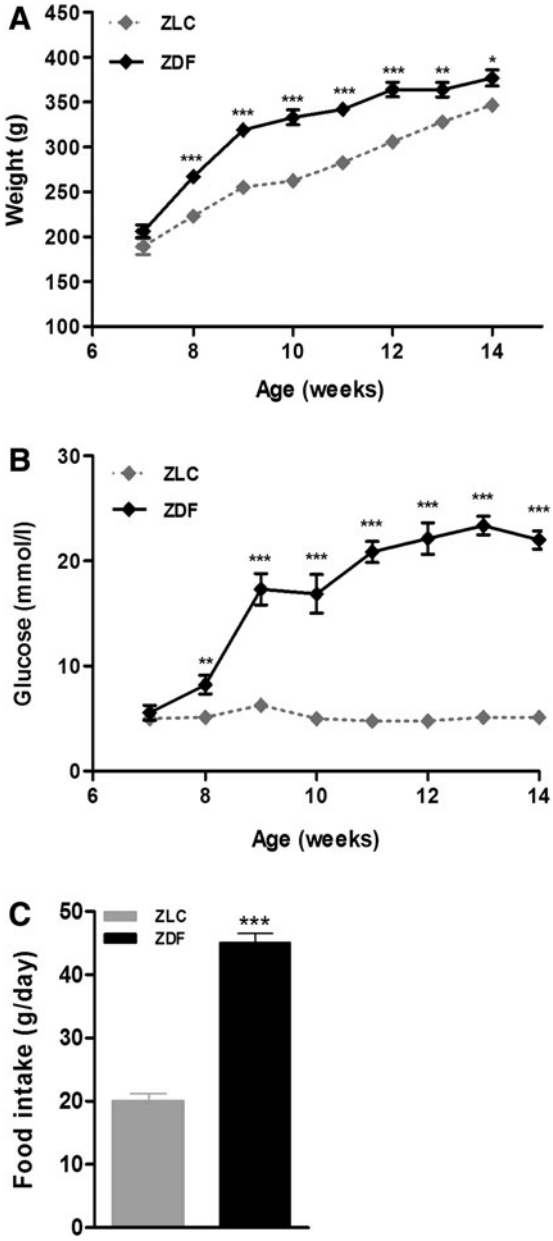
1. Clark JB, CJ Palmer and WN Shaw. (1983). The diabetic Zucker fatty rat. Proc Soc Exp Biol Med 173:68–75.
2. Miyahara Y, N Nagaya, M Katsoka, B Yanagawa, K Tamaka, H Hao, et al. (2006). Monolayered mesenchymal stem cells repair scarred myocardium after myocardial infarction. Nat Med 12:459–465.



SUPPLEMENTARY FIG. S1. Notch activation in adipose-derived stem cells (ASCs) from visceral adipose tissue (V_{WAT}) by phenethyl isothiocyanate (PEITC). ASCs from mesenteric adipose tissues (ME_{WAT}) were pretreated with 5 μM PEITC and induced to differentiate to adipocytes. Adipogenic differentiation potential was evaluated by the gene expression of adipocyte molecular markers (**A**). $*P<0.05$, $**P<0.01$, $***P<0.001$ versus undifferentiated ASCs. The response to PEITC was assessed by the gene expression of the members of Notch pathway (**B–D**). Each data point was normalized according to the *Rplp0* expression level and is presented as gene expression levels relative to reference gene. The data are the mean ± SEM ($n=4$, in technical duplicates).



SUPPLEMENTARY FIG. S2. Notch inhibition in ASCs from subcutaneous adipose tissue (SC_{WAT}) by N-[N-(3,5-difluorophenacetyl-L-alanyl)]-S-phenylglycine t-butyl ester (DAPT). ASCs from SC_{WAT} were pretreated with 50 μM DAPT and induced to differentiate to adipocytes. Adipogenic differentiation potential was evaluated by the gene expression of adipocyte molecular markers (**A**). ***$P < 0.001$ versus undifferentiated ASCs. The response to DAPT was assessed by the gene expression of the members of Notch pathway (**B–D**). Each data point was normalized according to the *Rplp0* expression level and is presented as gene expression levels relative to reference gene. The data are the mean ± SEM ($n = 4$, in technical duplicates).



SUPPLEMENTARY FIG. S3. Rat weights (**A**) and fasting blood glucose levels (**B**) were recorded weekly in all animals. (**C**) Food intake was recorded daily in all animals. The data are the mean ± SEM ($n = 6$ per group). *$P < 0.05$, **$P < 0.01$, ***$P < 0.001$ Zucker diabetic fatty (ZDF) versus Zucker lean normoglycemic control (ZLC).

Supplementary Table S1. List of TaqMan Gene Expression Assays Used for Real-Time Polymerase Chain Reaction

Gene symbol	*TaqMan gene expression assay reference*
Cd29	*Rn00566727_m1*
Cd36	*Rn01442640_g1*
Cd44	*Rn00563924_m1*
Cd73	*Rn00665212_m1*
Cd90	*Rn00562048_m1*
Cd105	*Rn01438763_m1*
Cd166	*Rn00582112_m1*
C/ebpα	*Rn00560963_s1*
Col1a1	*Rn01463848_m1*
Dll1	*Rn00583276_m1*
Dll3	*Rn00586568_m1*
Dll4	*Rn01512886_m1*
Dnmt3b	*Rn01536414_g1*
Fabp4	*Rn00670361_m1*
Fgf2	*Rn00570809_m1*
Hes1	*Rn00577566_m1*
Hes7	*Rn01464206_m1*
Hey1	*Rn00468865_m1*
Hey2	*Rn01537342_m1*
HeyL	*Rn01749696_m1*
Jag1	*Rn00569647_m1*
Lpl	*Rn00561482_m1*
Notch1	*Rn01758633_m1*
Notch2	*Rn00577522_m1*
Notch3	*Rn00571731_m1*
Notch4	*Rn01525719_m1*
Podxl	*Rn00593804_m1*
Pou5f1	*Rn01532129_g1*
Pparγ	*Rn00440945_m1*
Rplp0	*Rn00821065_g1*
Sox2	*Rn01286286_g1*
Tert	*Rn01409454_m1*

C/ebpα, CCAAT/enhancer binding protein α; *Col1a1*, collagen type α1; *Dll*, delta-like; *Dnmt3b*, DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 3β; *Fabp4*, fatty acid binding protein; *Fgf2*, fibroblast growth factor 2; *Hes*, hairy and enhancer of split; *Hey*, hairy/enhancer of split related with YRPW motif; *Jag1*, jagged 1; *Lpl*, lipoprotein lipase; *Podxl*, podocalyxin-like protein 1; *Pou5f1*, POU domain class 5 transcription factor 1; *Pparγ*, peroxisome proliferator activated receptor γ; *Rplp0*, ribosomal protein, large, P0; *Sox2*, SRY (sex determining region Y) box 2; *Tert*, telomerase reverse transcriptase.

Supplementary Table S2. Metabolic Profile

	ZLC	*ZDF*	P *value*
Total cholesterol (mg/dL)	93.83 ± 7.73	197.50 ± 12.56	< 0.0001
Glucose (mg/dL)	92.43 ± 1.99	392.75 ± 11.62	< 0.0001
HDL cholesterol (mg/dL)	30.35 ± 9.94	76.03 ± 38.23	ns
Triacylglycerols (mg/dL)	119.50 ± 13.31	856.67 ± 93.20	< 0.0001
Urea (mg/dL)	48.31 ± 3.14	59.17 ± 1.13	0.0086
Protein (g/dL)	7.38 ± 0.39	7.95 ± 0.64	ns
GOT (U/L)	74.82 ± 8.50	82.81 ± 18.43	ns
GPT (U/L)	40.61 ± 2.65	74.99 ± 12.75	0.0248
Creatinine (mg/dL)	0.62 ± 0.10	0.59 ± 0.07	ns
Insulin (ng/mL)	0.25 ± 0.07	0.87 ± 0.17	0.0095

The data are the mean ± SEM ($n = 6$ per group).

GOT, glutamic oxaloacetic transaminase; GPT, glutamic pyruvic transaminase; HDL, high-density lipoprotein; ns, not statistically significant; ZDF, Zucker diabetic fatty; ZLC, Zucker lean normoglycemic control.

Supplementary Table S3. Adipogenic Differentiation Potential of Adipose-Derived Stem Cells

Adipocyte cell marker	*EC*		*ED*		*ME*		*RP*		*SC*	
	Ratio	P *value*	*Ratio*	P *value*	*Ratio*	P *value*	*Ratio*	P *value*	*Ratio*	P *value*
					ZLC					
Cd36	+30.56	0.00281	+111.13	0.00411	+10.41	0.00033	+314.76	0.00463	+22775.10	4.77E-13
Cebpα	+17.29	0.00138	+5.43	0.01067	+2.40	0.00210	+10.25	0.00794	+9.81	3.80E-07
Fabp4	+1991.45	0.00043	+121.46	0.03157	+12.50	0.00709	+130.75	0.02472	+4362.39	1.12E-09
Lpl	+4.03	0.06621	+4.36	0.02758	+2.36	0.00263	+2.09	0.29396	+1.70	0.11787
Pparγ	+30.56	0.00281	+6.60	0.08299	+2.92	0.00504	+35.85	0.00793	+100. 61	3.47E-09
					ZDF					
Cd36	+8696.90	0.00017	+61.64	0.00870	+103.41	0.00403	+1191.93	0.00135	+23530.20	9.51E-16
Cebpα	+34.49	0.00578	+5.67	0.00017	+6.69	0.00435	+24.83	0.00637	+24.01	4.70E-09
Fabp4	+14649.00	2.18E-05	+240.77	0.00744	+112.07	0.00385	+1361.34	0.00264	+10599.80	2.57E-09
Lpl	+11.10	0.01090	+5.57	0.00842	+4.10	0.01881	+6.03	0.02758	+3.74	0.000538
Pparγ	+23.22	0.01155	+4.84	0.00128	+5.75	3.68e-06	+40.51	0.01080	+55.84	3.46E-09

ASCs from different fat depots were induced to differentiate to adipocytes. After 21 days, differentiation capacity was evaluated by the expression of the adipocyte cell markers. Each data was normalized according to *Rplp0* expression and is presented as ratio of differentiated versus undifferentiated ASCs ($n = 3$–4, in technical duplicates).

ASCs, adipose-derived stem cells; C/ebpα, CCAAT/enhancer binding protein α; EC, epicardial; ED, epididymal; Fabp4, fatty acid binding protein 4; Lpl, lipoprotein lipase; ME, mesenteric; Pparγ, peroxisome proliferator activated receptor γ; RP, retroperitoneal; SC, subcutaneous.

ARTÍCULO 2

"Systems biology approach to identify alterations in the stem cell reservoir of subcutaneous adipose tissue in a rat model of diabetes: effects on differentiation potential and function"

Raquel Ferrer-Lorente[1], Maria Teresa Bejar[1], Monica Tous[1], Gemma Vilahur[1], Lina Badimon[1,2]

[1]Cardiovascular Research Center, CSIC-ICCC , Hospital de la Santa Creu i Sant Pau (UAB), Barcelona, Spain.

[2]Cardiovascular Research Chair, UAB, Barcelona, Spain.

Publicado en: Diabetologia. 2014 Jan; 57(1):246-56.

Factor de impacto (2014): 6.671

RESUMEN

Enfoque de biología de sistemas para la identificación de alteraciones en el reservorio de células madre de tejido adiposo subcutáneo en un modelo de diabetes en rata: efectos sobre la función y el potencial de diferenciación

Las células progenitoras autólogas representan una opción prometedora en terapia celular regenerativa. Sin embargo, se ha demostrado que la edad y los factores de riesgo cardiovascular como la diabetes afectan las células progenitoras endoteliales circulantes y las células madre derivadas de médula ósea, limitando su potencial terapéutico. Aún así, su impacto sobre otras poblaciones celulares es aún desconocido. El objetivo de este estudio es investigar los efectos de la diabetes sobre las células madre derivadas de tejido adiposo (ASC) y si esos efectos podrían limitar el potencial terapéutico de las ASC autólogas.

Mediante un análisis de biología de sistemas se estudió la expresión de genes relacionados con la identificación de células madre en tejido adiposo subcutáneo, la fracción vascular del estroma, y ASC aisladas y cultivadas de ratas diabéticas obesas y de controles sanos. Se analizó complementariamente

un modelo de diabetes sin obesidad. El análisis del significado biológico de estos cambios se realizó mediante técnicas bioinformáticas. Además se realizaron estudios funcionales de viabilidad celular y potencial de diferenciación.

Se observó una tendencia a la regulación a la baja de marcadores de célula madre en el tejido adiposo subcutáneo de las ratas diabéticas. La expresión génica y el análisis *in silico* revelaron un efecto significativo en moléculas involucradas en el mantenimiento de la multipotencia y la auto-renovación, y en la alteración de vías de señalización importantes en el mantenimiento de las células madre. Tanto la viabilidad como el potencial de diferenciación de las ASC de ratas diabéticas aparecieron reducidos en modelos *in vitro* como en ensayos de angiogénesis *in vivo*.

Por tanto, nuestros resultados indican que el impacto de la diabetes mellitus tipo 2 puede comprometer la eficiencia de auto-reparación endógena, así como de la terapia celular autóloga con ASC.

Diabetologia
DOI 10.1007/s00125-013-3081-z

ARTICLE

Systems biology approach to identify alterations in the stem cell reservoir of subcutaneous adipose tissue in a rat model of diabetes: effects on differentiation potential and function

Raquel Ferrer-Lorente · Maria Teresa Bejar · Monica Tous · Gemma Vilahur · Lina Badimon

Received: 30 January 2013 / Accepted: 24 September 2013
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2013

Abstract
Aims/hypothesis Autologous progenitor cells represent a promising option for regenerative cell-based therapies. Nevertheless, it has been shown that ageing and cardiovascular risk factors such as diabetes affect circulating endothelial and bone marrow-derived progenitor cells, limiting their therapeutic potential. However, their impact on other stem cell populations remains unclear. We therefore investigated the effects of diabetes on adipose-derived stem cells (ASCs) and whether these effects might limit the therapeutic potential of autologous ASCs.
Methods A systems biology approach was used to analyse the expression of genes related to stem cell identification in subcutaneous adipose tissue (SAT), the stromal vascular fraction and isolated ASCs from Zucker diabetic fatty rats and their non-diabetic controls. An additional model of type 2 diabetes without obesity was also investigated. Bioinformatic approaches were used to investigate the biological significance of these changes. In addition, functional studies on cell viability and differentiation potential were performed.
Results Widespread downregulation of mesenchymal stem cell markers was observed in SAT of diabetic rats. Gene expression and in silico analysis revealed a significant effect on molecules involved in the maintenance of pluripotency and self-renewal, and on the alteration of main signalling pathways important for stem cell maintenance. The viability and differentiation potential of ASCs from diabetic rats was impaired in in vitro models and in in vivo angiogenesis.
Conclusions/interpretation The impact of type 2 diabetes on ASCs might compromise the efficiency of spontaneous self-repair and direct autologous stem cell therapy.

Keywords Adipose-derived stem cells · Cell therapy · Differentiation potential · Gene expression and in silico analysis · Pluripotency · Stemness · Subcutaneous adipose tissue · Type 2 diabetes

Abbreviations

ASCs	Adipose-derived stem cells
$ASCs^{ChDMII}$	ASCs from ChDMII rats
$ASCs^{ZDF}$	ASCs from ZDF rats
$ASCs^{ZLC}$	ASCs from ZLC rats
AU	Arbitrary units
BMPCs	Bone marrow-derived progenitor cells
ChDMII	Chemically generated rat model of non-obese type 2 diabetes
EC	Endothelial cell
EPCs	Endothelial progenitor cells
FGF	Fibroblast growth factor
IPA	Ingenuity Pathway Analysis
MSCs	Mesenchymal stem cells
MTS	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt (assay)
SAT	Subcutaneous adipose tissue
SVF	Stromal vascular fraction
ZDF	Zucker diabetic fatty
ZLC	Zucker lean normoglycaemic control

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00125-013-3081-z) contains peer-reviewed but unedited supplementary material, which is available to authorised users.

R. Ferrer-Lorente · M. T. Bejar · M. Tous · G. Vilahur · L. Badimon (✉)
Cardiovascular Research Center, CSIC-ICCC, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau (UAB), C/Sant Antoni Maria Claret 167, 08025 Barcelona, Spain
e-mail: lbadimon@csic-iccc.org

R. Ferrer-Lorente · G. Vilahur · L. Badimon
Centro de Investigación Biomédica en Red de Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición (CIBERObn), Spain
URL: www.ciberobn.com

Published online: 17 October 2013

Introduction

Cell therapy is a promising option for tissue engineering and regenerative medicine. In recent years, numerous animal studies on cell therapy as a potential treatment for ischaemic diseases have been conducted and shown promising results [1, 2], in particular studies using bone marrow-derived progenitor cells (BMPCs) [3, 4]. Nevertheless, the translation of such therapies into clinical trials has generated controversy [5, 6]. It has been shown that ageing and cardiovascular risk factors such as diabetes affect endothelial progenitor cells (EPCs) and BMPCs, thereby limiting their therapeutic potential [7–11]. However, the effect of the above risk factors on other stem cell populations remains unclear.

Mesenchymal stem cells (MSCs) were first discovered as clonogenic, adherent colony-forming fibroblastic cells that are present in bone marrow stroma [12]. The key characteristics of MSCs include: adherence to plastic, extensive proliferative capacity, expression of several common cell surface antigens and the ability to differentiate into many lineage-specific cell types [13, 14]. For many years, BMPCs were considered the major source of stem cells for tissue engineering applications. However, it is now known that MSCs reside in all organs and tissues [15]. Due to their abundance and ease of collection, stem cells isolated from adipose tissue (adipose-derived stem cells [ASCs]) have in recent years generated rapidly growing interest in their developmental plasticity and therapeutic potential [16, 17]. Clinically relevant stem cell numbers can be isolated from adipose tissue, as ASCs have higher proliferation rates than BMPCs [18]. ASCs are an abundant and practical source of donor tissue for autologous cell replacement [19, 20].

Our aim therefore was to investigate the possible effects of diabetes on ASCs and whether these effects might limit the efficiency of autologous ASC transplantation in diabetic patients. Our investigations were performed using two models of diabetes: (1) the Zucker diabetic fatty (ZDF) ($Lepr^{fa/fa}$) rat, which is a genetic model of type 2 diabetes and obesity [21]; and (2) age-matched Zucker lean normoglycaemic control (ZLC) ($Lepr^{fa/+}$/$Lepr^{+/+}$) rats, a second model of biochemically induced diabetes without obesity [22].

Methods

Animals

All procedures followed in the study fulfilled the criteria of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the US National Institutes of Health (NIH Publication number 85-23, revised 1996) and were approved by the Internal Animal Committee Review Board.

Zucker diabetic fatty rats We purchased 7-week-old male ZDF and ZLC rats from Charles River Laboratories (L'Arbresle Cedex, France). Only ZDF rats had blood glucose levels of >16.65 mmol/l from 11 weeks of age (electronic supplementary material [ESM] Fig. 1).

Rat model of non-obese type 2 diabetes We used a chemically generated rat model of non-obese type 2 diabetes (ChDMII) based on ZLC rats, which were made diabetic by a combination of nicotinamide (230 mg/kg, i.p.) injected 15 min before streptozotocin (65 mg/kg, i.v.) [22].

Nude Balb/c mice We purchased 8-week-old nude Balb/c mice from Janvier Laboratories (Le Genet-St-Isle, France) and used them for in vivo angiogenesis assays.

A detailed description of the protocols is available in the ESM (Methods, section 1.1).

Serum determinations

Blood was collected, centrifuged and stored at −80°C for further analysis. Biochemical analyses were determined with an analyser (CLIMA MC-15; RAL, Barcelona, Spain).

Isolation and culture of ASCs

Subcutaneous adipose tissue (SAT) was excised and processed as detailed in the ESM (Methods, section 1.2) to obtain ASCs.

Flow cytometry

Freshly collected stromal vascular fraction (SVF) and cultured ASCs were characterised by flow cytometry. A detailed description of the protocol and antibodies used is available in the ESM (Methods, section 1.3).

ASC viability and detection of apoptosis in vitro

Cell viability was evaluated by using the colorimetric 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt (MTS) assay (CellTiter 96 AQ_{ueous} One Solution Cell Proliferation Assay; Promega, Madison, WI, USA). Apoptotic cells were detected using an in situ apoptosis detection kit (ApopTag Red; Chemicon, Temecula, CA, USA) and an annexin V-FITC apoptosis detection kit (BD Biosciences, San Diego, CA, USA). The protocols are described in detail in the ESM (Methods, sections 1.4 and 1.5).

Gene expression and in silico analysis

Total RNA was isolated from SAT and ASCs using kits (SAT: RNeasy lipid tissue kit, ASCs: RNeasy mini isolation kit, both

from Qiagen, Valencia, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. cDNA was synthesised from 1 μg total RNA using a high-capacity cDNA archive kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and analysed by real-time PCR using the Prism 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems) according to the manufacturer's instructions. mRNA expression in ASCs and SAT was normalised against the average expression of two reference genes, *Rplp0* and *Rpl13a*, the stability of whose expression was validated using geNorm version 3.5 software (http://medgen.ugent.be/genorm). The respective cycle threshold (C_t) values in ZLC were 20.12 and 24.5 for SAT, and 17.59 and 18.4 for ASCs. The mean expression of reference genes differed between ZLC and ZDF rats by factors of 1.04 and 1.26 in ASCs and SAT, respectively. mRNA expression in ASCs after adipogenic, osteogenic and endothelial differentiation was normalised against the expression of the reference gene *Rplp0*, which differed in cells of ZLC and ZDF rats by factors of 0.65, 0.72 and 1.0, respectively. TaqMan gene expression assays and sequences of the primers used are provided in ESM Table 1.

Gene expression in the SVF was analysed by a specific array (Rat Stem Cell PCR; SA Biosciences, Frederick, MD, USA), using pooled material due to the limited number of samples. The contribution of each sample was equal. A detailed description of the protocols is available in the ESM (Methods, section 1.6).

The Ingenuity Pathway Analysis (IPA) software package (Ingenuity Systems, www.ingenuity.com) was used to gain insight into biological functions and pathways represented by the differentially expressed transcripts in each group.

In vitro ASC differentiation

Adipogenic, osteogenic and endothelial cell (EC) differentiation assays were performed using specific differentiation media. Detailed protocols can be found in the ESM (Methods, section 1.7).

Angiogenesis assay in vivo

Nude mice (8 weeks old) were injected subcutaneously with 4×10^6 undifferentiated ASCs diluted in 400 μl cold, growth factor-reduced Matrigel (BD Biosciences). As a control, Matrigel without cells was also injected. After 7 days, mice were killed and Matrigel plugs were removed, photographed and processed for histological analysis or haemoglobin assessment. For detailed methods, see ESM (Methods sections 1.8 and 1.9).

Statistical analyses

Results are expressed as mean ± SEM. Student's *t* test or one-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test were used for statistical analysis using a software package (GraphPad, La Jolla, CA, USA). A value of $p<0.05$ was considered significant.

IPA software uses right-tailed Fisher's exact test to calculate the *p* value, thus determining the probability that biological functions are affected. The regulation *z* score algorithm is used to make predictions on whether functions should increase or decrease given the observed gene expression changes. The *z* score algorithm is designed to reduce the chance that random data will generate significant predictions. An absolute *z* score of ≥2 is considered significant.

Results

Metabolic profile

Metabolic profiles of ZDF and ZLC rats are detailed in ESM Table 2. ZLC rats had normal blood glucose levels (5.13±0.11 mmol/l), whereas those of ZDF rats were significantly higher (21.80±0.64 mmol/l, $p<0.0001$ vs controls), clearly reflecting their diabetic status (ESM Fig. 1). Significantly increased levels of total cholesterol, triacylglycerol, urea and glutamic pyruvic transaminase were also observed in ZDF compared with ZLC rats.

Primary culture of ASCs increases specific stem cell markers

Results revealed the presence of low numbers of stem cells in the SVF. After in vitro culture (passage 3), most adherent cells expressed CD29 (over 95%), CD90 (over 94%) and CD44 (44–60%), and were negative for the haematopoietic marker CD45 (0.2%). No differences between groups were observed (ESM Table 3).

ASCs from ZDF rats exhibit loss of viability

Loss of viability was observed during in vitro culture of ASCs from ZDF rats ($ASCs^{ZDF}$). Flow cytometric analysis revealed a significant decrease in the percentage of live $ASCs^{ZDF}$ cells compared with ASCs from ZLC rats ($ASCs^{ZLC}$) (ESM Fig. 2a). To confirm our observations, the viability of ASCs was measured. The MTS assay showed that the number of viable cells in $ASCs^{ZDF}$ cultures was significantly lower than in $ASCs^{ZLC}$ cultures (ESM Fig. 2b). To determine whether this difference was due to an increased incidence of cell death, apoptosis assays were performed. A significantly increased percentage of apoptotic cells was detected in $ASCs^{ZDF}$ cultures compared with $ASCs^{ZLC}$ (ESM Fig. 2c). The Annexin V-FITC apoptosis detection kit also showed an increase in apoptotic cells (ESM Fig. 2d).

The expression of genes that define stemness is significantly decreased in ASCs^{ZDF}

Considering the possible effects of diabetes on ASC characteristics, we investigated the expression of genes related to stem cell identification, maintenance and growth. To confirm the effects on ASC content and that the differences observed between ASCs were due to the effects of diabetes and not induced by culture conditions, we analysed the gene expression profiles of SAT and the SVF. Most of the genes analysed were downregulated in diabetic animals.

Gene expression analysis of ASCs for MSC markers (*Cd29* [also known as *Itgb1*], *Cd44*, *Cd73* [also known as *Nt5e*], *Cd90* [also known as *Thy1*], *Cd105* [also known as *Eng*], *Cd166* [also known as *Alcam*] and collagen type α1 [*Col1a1*]) revealed no significant differences between both groups, although, interestingly, ASCs^{ZDF} had widespread decreased expression of these markers (Fig. 1). The analysis performed on tissue revealed that diabetes was associated with an overall downregulation of MSC-specific markers. Statistically significant reductions were found for *Cd44*, *Cd90*, *Cd105*, *Cd166* and *Col1a1* (Fig. 2).

The expression of genes that define stemness markers was severely perturbed in diabetic SAT, just as in the derived ASCs, highlighting the decreased expression of *Pou5f1*. Other genes involved in maintaining pluripotency and self-renewal showed significantly reduced expression in diabetic samples, e.g. *Fgf4* and *Podxl* in ASCs (Fig. 1), and *Dnmt3b*, *Fgf2*, *Sox2*, *Tert* and *Podxl* in SAT (Fig. 2). Moreover, changes in genes encoding molecules related to signalling pathways important for stem cell maintenance (Notch, Wnt and Hedgehog pathways) and linked to cellular movement (*Cxcl12* and *Cxcr4*) were observed. These changes reached significance for *Dll1* and *Notch2* in ASCs (Fig. 1), and for *Notch1*, *Notch2* and *Cxcl12* in tissue (Fig. 2).

SVF gene expression analysis showed the same pattern. We observed a widespread downregulation of stem cell markers in this compartment (ESM Fig. 3), again suggesting that the pluripotent capacity was attenuated.

In silico analysis shows the impact of diabetes on pluripotency, self-renewal and the differentiation potential of ASCs

To identify molecular pathways and functional assignments that differ between the two groups, thus allowing a biological interpretation of these differences, the lists of genes were uploaded into the IPA software. IPA highlighted the implication of downregulation of these genes in cell cycle progression, cellular growth and proliferation, cellular movement, and cardiovascular system development and function. The analysis made it possible to detect related genes, and subsequently analysed and confirmed that genes involved in the maintenance of pluripotency and self-renewal pathways were

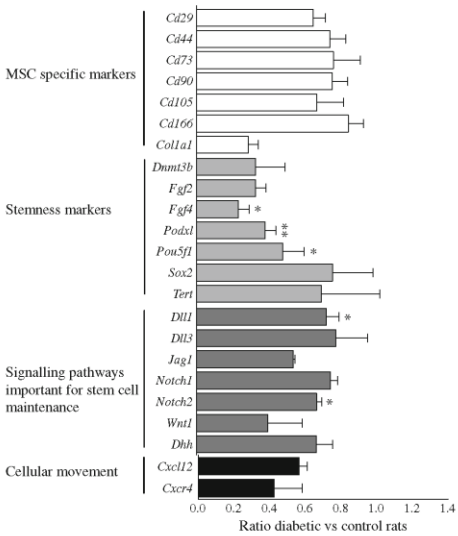


Fig. 1 Gene expression profile of cultured ASCs after three passages. The presence of stem cell-specific markers in subcutaneous ASCs was analysed by real-time PCR. Each data point is presented as the ratio of ASCs^{ZDF}:ASCs^{ZLC}; $n=5$–6 per group, in technical duplicates; $*p<0.05$ and $**p<0.01$ for ASCs^{ZDF} vs ASCs^{ZLC}

downregulated in diabetic samples (Tables 1 and 2, ESM Fig. 4).

In agreement with our functional observations in cell viability assays, IPA predicted a decrease of proliferation-related ($p=2.22\times10^{-11}$, z score −2.232) and an increase of apoptosis-related ($p=9.56\times10^{-9}$, z score 2.718) gene expression in ASCs^{ZDF} compared with ASCs^{ZLC}.

Changes to the in vitro differentiation potential of ASCs^{ZDF}

Adipogenic differentiation Morphological changes associated with adipogenesis were faster and higher in ASCs^{ZDF}, as also evidenced by a marked increase in Herxheimer staining (Fig. 3a). The microscopic observations were confirmed by expression levels of adipogenic markers (Fig. 3b). Both cell types were able to differentiate into adipocytes, showing significant increases in expression of the adipocyte markers *Lpl*, *Fabp4*, *Cd36* and *Pparg*. However, differentiated ASCs^{ZDF} had higher expression of *Lpl* ($p=0.0012$), *Fabp4* ($p=0.0405$), *Cd36* ($p=0.0201$) and *Pparg* ($p=$NS) than differentiated ASCs^{ZLC}. This pattern of expression showed that the adipogenic differentiation potential of ASCs^{ZDF} was higher than that of ASCs^{ZLC}.

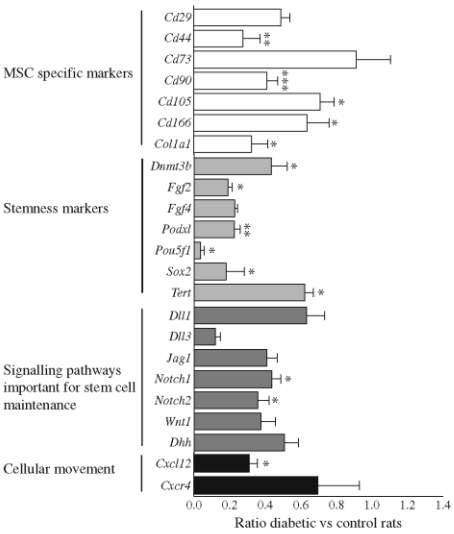


Fig. 2 Gene expression analysis of SAT. The presence of stem cell-specific markers in SAT was analysed by real-time PCR. Each data point is presented as the ratio of ZDF:ZLC; $n=5$–6 per group, in technical duplicates; $*p<0.05$, $**p<0.01$ and $***p<0.001$ for ZDF vs ZLC

Osteogenic differentiation Real-time PCR analysis of lineage-specific genes indicated differences in osteogenic differentiation between $ASCs^{ZDF}$ and $ASCs^{ZDF}$. Both cell types were able to differentiate (Fig. 4a, b), showing significantly increased expression of genes encoding the osteogenic markers osteopontin (*Spp1*), alkaline phosphatase 1 (*Alpl*) and osteocalcin (*Bglap*) (Fig. 4b). Thus, in contrast to adipogenic differentiation, $ASCs^{ZDF}$ had reduced osteogenic potential.

Endothelial cell differentiation To investigate whether diabetes affects EC differentiation potential, we measured the expression of specific markers in ASCs and capillary-like tube formation in Matrigel. $ASCs^{ZLC}$ and $ASCs^{ZDF}$ showed increased expression of *Pecam1* after differentiation ($ASCs^{ZLC}$ $p<0.0001$, $ASCs^{ZDF}$ $p=0.0109$), whereas the expression of *Cd105* only increased significantly in $ASCs^{ZLC}$ (Fig. 5a). Although both differentiated ASC groups were able to develop capillary-like networks (Fig. 5b), the ability of $ASCs^{ZDF}$ was significantly impaired compared with that of $ASCs^{ZLC}$ (Fig. 5c). To study in-depth the angiogenic potential of ASCs, we measured the expression of genes encoding the anti-angiogenic factors endostatin (*Col18a1*), thrombospondin-1 (*Thbs1*) and serpin peptidase inhibitor, clade E (*Serpine1*) (ESM Fig. 5a). Interestingly, $ASCs^{ZDF}$ had significantly higher expression levels of endostatin ($p=0.0311$) and a non-significant increase in expression of *Thbs1* and *Serpine1*. On the other hand, when ASCs were differentiated the expression of anti-angiogenic factors tended to decrease, reaching significance for *Serpine1* in both types of cells (ESM Fig. 5b).

Angiogenesis in vivo

Macroscopic observations of the retrieved plugs at day 7 post-implant showed angiogenesis in both types of ASC (Fig. 6a). However, haemoglobin quantification (Fig. 6b) and histological examination (Fig. 6c) revealed that the ability to stimulate microvessel growth was impaired in $ASCs^{ZDF}$. The haemoglobin content was only significantly increased in the $ASCs^{ZLC}$ plugs with respect to control plugs (without ASCs) ($p=0.0239$). A higher level of von Willebrand factor was also evident in the plugs containing $ASCs^{ZLC}$.

Impaired function in $ASCs^{ZDF}$ is not due to leptin receptor deficiency

ASCs from ChDMII rats ($ASCs^{ChDMII}$) were also investigated to distinguish between the impact of diabetes and that of leptin receptor deficiency on ASCs. Gene expression profiles for $ASCs^{ChDMII}$ and $ASCs^{ZDF}$ were similar. Only the expression of *Cd166* differed significantly between $ASCs^{ChDMII}$ and $ASCs^{ZDF}$. The expression of *Fgf2* and *Pou5f1* was more significantly affected in $ASCs^{ChDMII}$ than in $ASCs^{ZDF}$ compared with controls (ESM Fig. 6).

In vitro differentiation assays confirmed that the differentiation potential in $ASCs^{ChDMII}$ and $ASCs^{ZDF}$ was equal. No significant differences in differentiation markers were observed between $ASCs^{ChDMII}$ and $ASCs^{ZDF}$ (Fig. 7). As with $ASCs^{ZDF}$, the adipogenic potential of $ASCs^{ChDMII}$ was higher than that of $ASCs^{ZLC}$, showing significantly higher expression of the adipocyte markers *Lpl*, *Fabp4* and *Cd36*; in contrast, osteogenic and EC differentiation capacity was reduced. Differentiated $ASCs^{ChDMII}$ only showed a significant increase in expression of the osteogenic marker *Spp1*, but this increase was significantly lower than in differentiated $ASCs^{ZLC}$. No significant increase of EC markers was observed in differentiated $ASCs^{ChDMII}$. Differentiated $ASCs^{ChDMII}$ were able to develop capillary-like networks of similar length to $ASCs^{ZDF}$ ($ASCs^{ChDMII}$ 2802 ± 636 arbitrary units [AU]; $ASCs^{ZDF}$ 3104 ± 580 AU), but these were significantly smaller than in $ASCs^{ZLC}$ (5507 ± 637 AU, $p=0.0310$).

Discussion

Autologous progenitor cells represent a novel treatment option for ischaemic complications requiring therapeutic revascularisation and vascular repair. One of the main groups of patients who could benefit from cellular therapy is patients

Table 1 Principal functions affected by diabetes

Biological functions			
Category	Function	p value	Top molecules associated
Cellular growth and proliferation	Proliferation of cells	2.22×10^{-11}	CD44, COL1A1, CXCL12, DLL1, DNMT3B, CD105, FGF2, FGF4, NOTCH1, NOTCH2, POU5F1, SOX2, TERT
Cellular growth and proliferation	Growth of cells	1.45×10^{-9}	CD44, CXCL12, DLL1, DNMT3B, CD105, FGF2, FGF4, NOTCH1, NOTCH2, POU5F1, SOX2, TERT
Cell cycle	Cell cycle progression	1.12×10^{-8}	CD44, COL1A1, CXCL12, FGF2, NOTCH1, NOTCH2, POU5F1, SOX2, TERT
Cell cycle	Arrest in cell cycle progression	4.13×10^{-7}	COL1A1, NOTCH1, NOTCH2, POU5F1, SOX2
Cell death	Apoptosis	9.56×10^{-9}	CD44, CXCL12, DLL1, DNMT3B, FGF2, NOTCH1, NOTCH2, POU5F1, TERT
Cell morphology	Tubulation of cells	1.52×10^{-9}	CD166, CXCL12, FGF2
Cellular movement	Transmigration of cells	4.09×10^{-8}	CD44, CXCL12, CD90
Cellular movement	Migration of cells	2.33×10^{-7}	CD166, CD44, COL1A1, CXCL12, DNMT3B, CD105, FGF2, PODXL, CD90
Cellular movement	Chemotaxis of endothelial cells	1.82×10^{-6}	CXCL12, FGF2,
Cellular movement	Mobilisation of stem cells	6.11×10^{-6}	CXCL12
Cell-to-cell signalling and interaction	Binding of cells	1.87×10^{-7}	CD44, CD166, CXCL12, FGF2, NOTCH1
Cellular development	Differentiation of cells	3.59×10^{-9}	CXCL12, DLL1, CD105, FGF2, FGF4, NOTCH1, POU5F1, SOX2, TERT
Cellular development	Differentiation of endothelial cells	1.33×10^{-4}	FGF2, NOTCH1
Cellular development	Endothelial cell development	6.82×10^{-7}	CD44, CD105, FGF2, NOTCH1
Tissue development	Tissue development	5.06×10^{-8}	CD44, COL1A1, CXCL12, DLL1, CD105, FGF2, NOTCH1
Tissue development	Osteogenesis	2.92×10^{-3}	CD44, COL1A1, CXCL12, DLL1, CD105, FGF2, NOTCH1
Cardiovascular system development and function	Development of blood vessel	5.37×10^{-13}	CD166, CD44, COL1A1, CXCL12, CD105, FGF2, NOTCH1, TERT
Cardiovascular system development and function	Vasculogenesis	4.58×10^{-12}	CD166, CD44, CXCL12, CD105, FGF2, NOTCH1, TERT
Cardiovascular system development and function	Angiogenesis	2.14×10^{-7}	CD166, CXCL12, CD105, FGF2, TERT

Gene expression data were visualised in the context of biological function using IPA software (Ingenuity System, www.ingenuity.com). The table shows the principal functions of the 70 biological functions significantly associated with the molecules analysed. The function analysis of IPA was generated on the basis of all currently available published data

p values are from Fisher's exact test right-tailed

Protein abbreviations: COL1A1, collagen type α1; CXCL12, chemokine (C-X-C motif) ligand 12; DLL1, delta-like 1; DNMT3B, DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 3β; PODXL, podocalyxin-like protein 1; POU5F1, POU domain class 5 transcription factor 1; SOX2, SRY (sex-determining region Y) box 2; TERT, telomerase reverse transcriptase

with diabetic complications, yet broadly dysfunctional cells may limit the feasibility of this approach. As many of these cells are being considered for clinical therapies, it is essential to validate the identity and potency of these cells.

The link between diabetes and impaired properties of EPCs and BMPCs is well established [7–10]. However, the impact of diabetes on other types of stem cell remains unclear. In this study, we analysed the effect of the presence of diabetes on ASCs. We compared ASCs from a rat model of diabetes and from age-matched non-diabetic rats, analysing their gene expression profiles, in vitro viability and differentiation potential. To confirm that the differences observed between both groups of ASCs were due to the effects of diabetes and rule out the possibility that changes were induced by in vitro culture and clonal expansion, we analysed the differences between animals in gene expression profiles of SAT and the SVF. As in any gene expression study, the selection of a valid endogenous control is critical to avoid misinterpretation of results. Thus, the suitability of endogenous control genes was evaluated in all experimental groups under comparison,

Table 2 Top modified canonical pathways in ZDF compared with ZLC rats

Top canonical pathways	
Pathway	*p* value
Notch signalling	1.76×10^{-9}
Human embryonic stem cell pluripotency	1.06×10^{-6}
Leucocyte extravasation signalling	6.16×10^{-6}
Role of Oct4 in mammalian embryonic stem cell pluripotency	3.71×10^{-5}
Wnt–β-catenin signalling	9.22×10^{-5}
FGF signalling	6.61×10^{-3}

Gene expression data were visualised in the context of biological function using IPA software (Ingenuity System, www.ingenuity.com). The table shows the top canonical pathways affected by diabetes; 26 pathways were significantly mapped. The pathway analysis of IPA was generated on the basis of all currently available published data

p values from Fisher's exact test right-tailed

confirming that the reference genes did not show a systematic bias that was causally related to the inherent diabetic phenotype. The C_t of endogenous genes showed no systematic variation in the ZDF compared with the ZLC group; in all

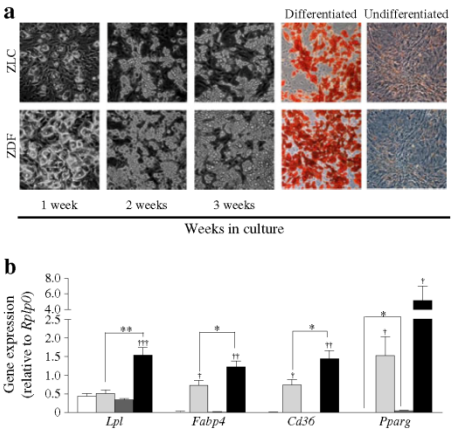


Fig. 3 Adipogenic differentiation of $ASCs^{ZDF}$ and $ASCs^{ZLC}$. ASCs isolated from ZDF rats showed greater adipogenesis than those from ZLC rats. (**a**) The evolution of morphological changes using a bright-field microscope (magnification ×20). Differentiation potency was evaluated by Herxheimer staining and (**b**) by lineage-specific gene expression patterns determined by real-time PCR using specific markers (*Lpl*, *Fabp4*, *Cd36* and *Pparg*). White bars, undifferentiated $ASCs^{ZLC}$; dark grey bars, undifferentiated $ASCs^{ZDF}$; light grey bars, differentiated $ASCs^{ZLC}$; black bars, differentiated $ASCs^{ZDF}$. Each data point (**b**) is presented as gene expression relative to the reference gene. The results are means ± SEM; $n=5$–6 per group, in technical duplicates; $^{*}p<0.05$ and $^{**}p<0.01$ for $ASCs^{ZDF}$ vs $ASCs^{ZLC}$; $^{\dagger}p<0.05$, $^{\dagger\dagger}p<0.01$ and $^{\dagger\dagger\dagger}p<0.001$ for differentiated vs undifferentiated cells

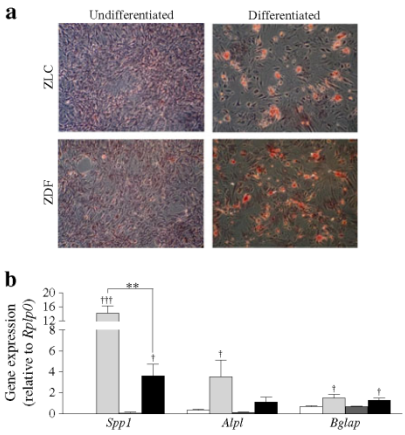


Fig. 4 Osteogenic differentiation of $ASCs^{ZDF}$ and $ASCs^{ZLC}$. (**a**) Differentiation potency was evaluated by Alizarin red staining and (**b**) by lineage-specific gene expression patterns determined by real-time PCR using specific markers (*Spp1*, *Alpl* and *Bglap*). White bars, undifferentiated $ASCs^{ZLC}$; dark grey bars, undifferentiated $ASCs^{ZDF}$; light grey bars, differentiated $ASCs^{ZLC}$; black bars, differentiated $ASCs^{ZDF}$. Each data point (**b**) is presented as gene expression relative to the reference gene. The results are means ± SEM; $n=5$–6 per group, in technical duplicates; $^{**}p<0.01$ for $ASCs^{ZDF}$ vs $ASCs^{ZLC}$; $^{\dagger}p<0.05$ and $^{\dagger\dagger\dagger}p<0.001$ for differentiated vs undifferentiated cells

cases, moreover, the small variability that we did observe ($\Delta C_t<0.5$) was the common variability associated with the procedure [23].

$ASCs^{ZDF}$ cultures showed a significant worsening in the course of time. To confirm our observations, viability and apoptosis assays were performed, showing impaired viability in $ASCs^{ZDF}$ compared with ASC^{ZLC}. Previous studies had shown increased apoptotic activity of MSCs after exposure in vitro to added high glucose concentrations [24].

In agreement with several studies [15, 18, 19], ASCs were positive for the MSC marker genes *Cd29*, *Cd44*, *Cd73*, *Cd90*, *Cd105*, *Cd166* and *Col1a1*. Interestingly, although gene expression analysis failed to reveal significant differences between the two groups, $ASCs^{ZDF}$ had decreased expression for these surface markers. The analysis performed for genes related to stem cell identification in SAT and the SVF revealed overall downregulation, possibly indicating that diabetes reduces the stem cell reservoir in SAT.

IPA enables gene expression data to be displayed in a systems biology context, showing a significant effect on signalling pathways important for stem cell maintenance. Results revealed a clear effect of diabetes on molecules involved in maintenance of pluripotency and self-renewal, highlighting the significant decreased expression of *Pou5f1*, which encodes an essential factor for maintenance of the pluripotent

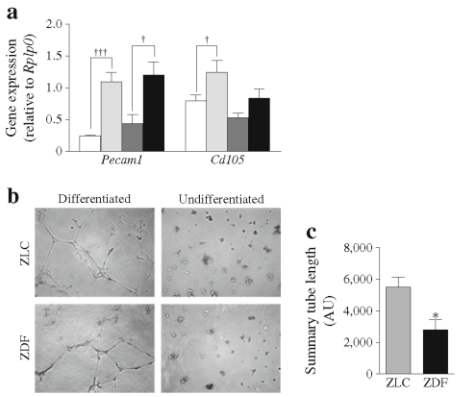


Fig. 5 Differentiation of ASCs^{ZDF} and ASCs^{ZLC} into ECs. (**a**) The acquisition of an endothelial phenotype was evaluated by specific endothelial marker genes (*Pecam1* and *Cd105*) using real-time PCR and (**b**) by a Matrigel in vitro tube formation assay. (**a**) Each data point is presented as gene expression levels relative to the reference gene. White bars, undifferentiated ASCs^{ZLC}; dark grey bars, undifferentiated ASCs^{ZDF}; light grey bars, differentiated ASCs^{ZLC}; black bars, differentiated ASCs^{ZDF}. (**c**) Quantification of total length of the tubes formed by differentiated ASCs. (**a, c**) The data are means ± SEM; n = 5–6 per group, (**a**) in technical duplicates; *p < 0.05 for ASCs^{ZDF} vs ASCs^{ZLC}; $^{\dagger}p$ < 0.05 and $^{\dagger\dagger\dagger}p$ < 0.001 for differentiated vs undifferentiated cells

state and for self-renewal in stem cells [25]. This transcription factor is not only required to maintain pluripotency in the developing embryo [26], but is also, as shown by several studies, associated with the undifferentiated pluripotent state of stem cell populations derived from adult tissues, as well as playing a role as reprogramming factor to induce pluripotent stem cells [27, 28].

Of the 26 pathways significantly mapped, Notch signalling was the top canonical pathway affected by diabetes. Notch signalling is implicated in the maintenance of self-renewal potential in stem cells [29]; its activation in stem cells leads to the maintenance of self-renewal potential through down-regulation of tissue-specific transcription factors, while its inhibition induced terminal differentiation [30]. Notch was shown to play a role in adipocyte differentiation from MSCs [30–33]. However, conflicting findings have been reported concerning its role. It has been argued that Notch is dispensable in adipocyte differentiation [30]; but other evidence shows that inhibition of Notch signalling or its target genes can inhibit adipocyte differentiation [31] or, in contrast, that Notch inhibition enhances adipogenesis [32, 33]. Here, we show an obvious inhibition of Notch signalling in ASCs^{ZDF}, which in agreement with the results of Huang et al [33] and Ugarte et al [32], would explain the overexpression of *Pparg* in undifferentiated ASCs^{ZDF} and their higher adipogenic differentiation potential.

Our analysis also disclosed an effect on the Wnt–β-catenin signalling pathway. Wnt signalling maintains pre-adipocytes in an undifferentiated state through inhibition of the pro-adipogenic transcription factors CCAAT- enhancer binding protein α and peroxisome proliferator-activated receptor γ [34]. Therefore, the higher expression of *Pparg* in undifferentiated ASCs^{ZDF} may be a result of the reduced *Wnt* (also known as *Wnt2*) expression, again indicating a greater predisposition to adipogenic differentiation in ASCs^{ZDF}.

Beside the Notch and Wnt pathways, the fate of MSCs is also determined by fibroblast growth factor (FGF) signalling [35]. Gene expression analysis also revealed an effect of diabetes on the FGF pathway, which has been implicated in cell survival, proliferation, pluripotency and the lineage determination of stem cells [36, 37]. FGF2 supports the osteogenic and chondrogenic differentiation potential of MSCs and a marked increase in adipocytes has been observed in BMSC cultures from *Fgf2*$^{-/-}$ animals [37]. The effect on FGF signalling might have contributed to the differences in adipogenic and osteogenic differentiation observed between ASCs^{ZDF} and ASCs^{ZLC}.

It has been reported that advanced glycation end-products interfere with in vitro differentiation of MSCs into adipogenic, chondrogenic and osteogenic lineages [38]. Pre-adipocytes of type 2 diabetes participants have shown decreased adipogenic differentiation capacity [39] and a high glucose concentration is a potent inhibitor of BMPC differentiation into osteoblastic

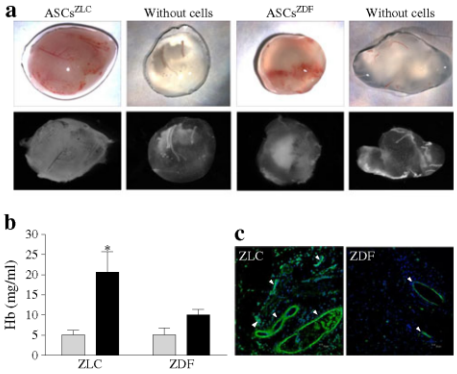


Fig. 6 Angiogenesis assay in vivo. (**a**) Macroscopic view of representative blood vessels formed in Matrigel plugs in vivo (n = 4 per group). Plugs were visualised and photographed with a Zoom 70XL (Optem; Fairport, NY, USA) coupled to a camera (Retiga 1300i Fast Camera; Surrey, BC, Canada), or with a fluorescence stereomicroscope (M165 FC; Leica; Wetzlar, Germany) (top to bottom row, respectively). (**b**) Quantification of haemoglobin (Hb) concentration using Drabkin's method. Grey bars, Matrigel without cells; black bars, Matrigel with ASCs. *p < 0.05 for Matrigel with ASCs vs Matrigel without cells. (**c**) Immunofluorescence staining for von Willebrand factor (green) and nucleus (blue). White arrowheads, neovessel formation

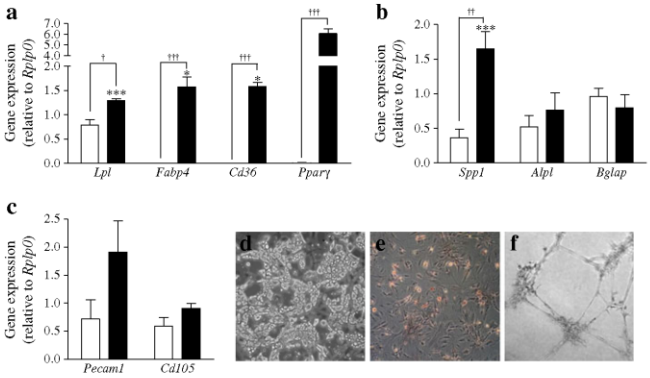


Fig. 7 Differentiation potential of ASCs from ChDMII rats. To evaluate the differentiation potential of ASCs from ChDMII rats, cells were induced to differentiate into adipocytes (**a**, **d**), osteoblasts (**b**, **e**) and ECs (**c**, **f**). White bars, undifferentiated ASCs^{ChDMII}; black bars, differentiated ASCs^{ChDMII}. The acquisition of a lineage-specific phenotype was evaluated by real-time PCR. Each data point is presented as gene expression levels relative to the reference gene. The results (**a**–**c**) are means ± SEM; $n=4$ per group, in technical duplicates. No significant differences were observed between ASCs^{ChDMII} and ASCs^{ZDF}. $^{*}p<0.05$ and $^{***}p<0.001$ for differentiated ASCs^{ChDMII} vs differentiated ASCs^{ZLC}; $^{\dagger}p<0.05$, $^{\dagger\dagger}p<0.01$ and $^{\dagger\dagger\dagger}p<0.001$ for differentiated ASCs^{ChDMII} vs undifferentiated ASCs^{ChDMII}

lineages [40]. In agreement with these studies, we observed impaired osteogenic differentiation of ASCs^{ZDF}. However, we found that the adipogenic differentiation potential of ASCs^{ZDF} was higher than that of ASCs^{ZLC}. Aguiari et al show that glucose-enriched medium induces the adipogenic differentiation of stem cells [41]. We propose that the effect of diabetes on Notch, Wnt and FGF signalling is the cause of ASCs^{ZDF} commitment to the adipogenic lineage compared with ASCs^{ZLC}. Therefore, the effects of type 2 diabetes in major signalling pathways implicated in the maintenance of the undifferentiated state might compromise the plasticity and self-renewal of ASCs and, consequently, the strategies for tissue regeneration in diabetic patients. Further studies will be required to confirm the involvement of these signalling pathways in the commitment of ASCs^{ZDF} to an adipogenic lineage.

To test whether diabetes affects the EC differentiation potential of ASCs, we induced their differentiation towards ECs. Although both differentiated ASC groups were able to develop capillary-like networks, the ability of ASCs^{ZDF} was significantly impaired. We also performed in vivo plug angiogenesis assays to study the ability of ASCs to form new vessels. Consistent with their in vitro EC differentiation capacity, ASCs^{ZDF} had an impaired ability to stimulate the formation of an extended network of microvessels in the implanted plug. Several studies have shown a role of the Notch and Wnt pathways in angiogenesis [42–44]. Notch signalling is required for angiogenesis in ischaemia models, and *Dll1*, the expression of which was lower in ASCs^{ZDF}, is essential for postnatal angiogenesis [45], while jagged-1 (*Jag1*), which we also found downregulated, enhances angiogenesis [46]. Recent reports have underlined the important role of the Wnt system in vascular morphogenesis and in organ-specific EC differentiation [47]. It has also been reported that anti-angiogenic factors, such as collagen, type XVIII, alpha 1, inhibit Wnt signalling activity [48]. Our results for gene expression analysis revealed a significant increase in expression of *Col18a1* in ASCs^{ZDF}. Therefore, the inhibition of signalling, with the increase in anti-angiogenic factors, might be responsible for the impaired capacity of ASCs^{ZDF} to develop newly formed microvessels.

Finally, because leptin is involved in regulating MSC differentiation [49, 50], we investigated another model of diabetes in addition to the ZDF leptin receptor-deficient model. Its gene expression profile, as well as differentiation potential, showed a similar pattern to ASCs^{ZDF} and ASCs^{ChDMII}. Therefore, we can conclude that the impaired differentiation potential observed in ASCs^{ZDF} is independent of leptin receptor deficiency.

In summary, this is to our knowledge the first report to analyse the effect of diabetes on molecules involved in the maintenance of pluripotency and self-renewal of ASCs. Our results indicate that the effects of diabetes on main signalling pathways implicated in the maintenance of an undifferentiated state are the cause of the greater ASCs^{ZDF} commitment to an adipogenic lineage, compared with ASCs^{ZLC}, and that this leads to a gradual depletion of the ASC pool.

For the first time, we demonstrate that the EC differentiation potential and the ability of ASCs^{ZDF} to develop capillary-like networks in vitro and in vivo are significantly impaired

compared with ASCs^{ZLC}. Functional results, as well as gene expression and subsequent in silico analysis show that the benefits of using ASCs derived from diabetic patients might be limited in angiogenic therapies. Collectively, our data also help to explain the reduced spontaneous self-repair of hypoxic and ischaemic damage in diabetic patients.

Acknowledgements The authors would like to thank J. Crespo (Flow Cytometry Department, Cardiovascular Research Center, CSIC-ICCC, Barcelona, Spain) for his technical help with flow cytometric analysis and M. Sanchez (Cardiovascular Research Center, CSIC-ICCC, Barcelona, Spain) for her excellent technical assistance.

Funding This work was supported by research grants from the Spanish Ministry of Health–Instituto de Salud Carlos III (CIBERobn-CB06/03 and RETIC TERCEL RD/06/0010/0017), the Spanish Ministry of Science and Innovation (PNS SAF2010/16549) and the Government of Catalonia (CTP-ITT 2009). RFL is recipient of a Sara Borrell contract from the Spanish Ministry of Science and Innovation–Instituto de Salud Carlos III. MTB has received a fellowship from Institut Català de Ciències Cardiovasculars. MT was a Postdoctoral Fellow of Fundacion de Investigacion Cardiovascular and a Juan de la Cierva investigator (Spanish Ministry of Science and Innovation, MICINN). GV is a Ramon y Cajal investigator (Spanish Ministry of Science and Innovation, MICINN).

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

Contribution statement RFL, GV and LB contributed to the study conception and design. RFL, MTB and MT contributed to the acquisition of data. RFL and MTB contributed to the analysis of data. RFL, MTB and LB contributed to the interpretation of data. RFL was responsible for writing the manuscript. All authors contributed to the revision of the manuscript and approved the final version to be published.

References

1. Pittenger MF, Martin BJ (2004) Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics. Circ Res 95:9–20
2. Van der Bogt KEA, Sheikh AY, Schrepfer S et al (2008) Comparison of different adult stem cell types for treatment of myocardial ischemia. Circulation 118:S121–S129
3. Kamihata H, Matsubara H, Nishiue T et al (2001) Implantation of bone marrow mononuclear cells into ischemic myocardium enhances collateral perfusion and regional function via side supply of angioblasts, angiogenic ligands, and cytokines. Circulation 104: 1046–1052
4. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S et al (2001) Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. Nature 410:701–705
5. Cleland JGF, Fremantle N, Coletta AP, Clark AL (2006) Clinical trials update from the American Heart Association: REPAIR-AMI, ASTAMI, JELIS, MEGA, REVIVE-II, SURVIVE, and PROACTIVE. Eur J Heart Fail 8:105–110
6. Gimble JM, Guilak F, Bunnell BA (2010) Clinical and preclinical translation of cell-based therapies using adipose tissue-derived cells. Stem Cell Res Ther 1:19
7. Tepper OM, Galiano RD, Capla JM et al (2002) Human endothelial progenitor cells from type II diabetics exhibit impaired proliferation, adhesion, and incorporation into vascular structures. Circulation 106: 2781–2786
8. Li TS, Furutani A, Takahashi M et al (2006) Impaired potency of bone marrow mononuclear cells for inducing therapeutic angiogenesis in obese diabetic rats. Am J Physiol Heart Circ Physiol 290: H1362–H1369
9. Fadini GP, Sartore S, Schiavon M et al (2006) Diabetes impairs progenitor cell mobilization after hindlimb ischaemia-reperfusion injury in rats. Diabetologia 49:3075–3084
10. Sharpless NE, DePinho RA (2007) How stem cells age and why this makes us grow old. Nat Rev Mol Cell Biol 8:703–713
11. Friedenstein AJ, Piatetzky-Shapiro II, Petrakova KV (1966) Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. J Embryol Exp Morpholog 16: 381–390
12. Dominici M, Le Blanc K, Mueller E et al (2006) Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. Cytotherapy 8:315–317
13. Chamberlain G, Fox J, Ashton B, Middleton J (2007) Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. Stem Cells 25:2739–2749
14. Da Silva ML, Chagastelles PC, Nardi NB (2006) Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. J Cell Sci 119:2204–2213
15. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P et al (2002) Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. Mol Biol Cell 13:4279–4295
16. Gimble JM, Katz AJ, Bunnell BA (2007) Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. Circ Res 100:1249–1260
17. Zhu Y, Liu T, Song K, Fan X, Ma X, Cui Z (2008) Adipose-derived stem cell: a better stem cell than BMSC. Cell Biochem Funct 26: 664–675
18. Schäffler A, Büchler C (2007) Concise review: adipose tissue-derived stromal cells—basic and clinical implications for novel cell-based therapies. Stem Cells 25:818–827
19. Madonna R, Geng YJ, de Caterina R (2009) Adipose tissue derived stem cells: characterization and potential for cardiovascular repair. Arterioscler Thromb Vasc Biol 29:1723–1729
20. Mizuno H, Tobita M, Uysal AC (2012) Adipose-derived stem cells as a novel tool for future regenerative medicine. Stem Cells 30:804–810
21. Clark JB, Palmer CJ, Shaw WN (1983) The diabetic Zucker fatty rat. Proc Soc Exp Biol Med 173:68–75
22. Masiello P, Broca C, Gross R et al (1998) Experimental NIDDM: development of a new model in adult rats administered streptozotocin and nicotinamide. Diabetes 47:224–229
23. Golzelniak K, Janke J, Engeli S, Sharma AM (2001) Validation of endogenous controls for gene expression studies in human adipocytes and preadipocytes. Horm Metab Res 33:625–627
24. Li YM, Schilling T, Benisch P et al (2007) Effects of high glucose on mesenchymal stem cell proliferation and differentiation. Biochem Biophys Res Commun 363:209–215
25. Nichols J, Zevnik B, Anastassiadis K et al (1998) Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. Cell 95:379–391
26. Boiani M, Schöler HR (2005) Regulatory networks in embryo-derived pluripotent stem cells. Nat Rev Mol Cell Biol 6:872–884
27. Riekstina U, Cakstina I, Parfejevs V et al (2009) Embryonic stem cell markers expression pattern in human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, adipose tissue, heart and dermis. Stem Cell Rev Rep 5:378–386
28. Park IH, Zhao R, West JA et al (2008) Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. Nature 451:141–146
29. Radtke F, Raj K (2003) The role of Notch in tumorigenesis: oncogene or tumor suppressor? Nat Rev Cancer 3:765–767
30. Nichols AM, Pan Y, Herreman A et al (2004) Notch pathway is dispensable for adypocite specification. Genesis 40:40–44

31. Garcés C, Ruiz-Hidalgo MJ, Font de Mora J et al (1997) Notch-1 controls the expression of fatty acid-activated transcription factors and is required for adipogenesis. J Biol Chem 272:29729–29734
32. Ugarte F, Ryser M, Thieme S et al (2009) Notch signalling enhances osteogenic differentiation while inhibiting adipogenesis in primary human bone marrow stromal cells. Exp Hematol 37:867–875
33. Huang Y, Yang X, Wu Y et al (2010) γ-Secretase inhibitor induces adipogenesis of adipose-derived stem cells by notch regulation of Notch and PPARγ. Cell Prolif 43:147–156
34. Laudes M (2011) Role of Wnt signalling in the determination of human mesenchymal stem cells into preadipocytes. J Mol Endocrinol 46:65–72
35. Lanner F, Rossant J (2010) The role of FGF/Erk signalling in pluripotent cells. Development 137:3351–3360
36. Zaragosi LE, Ailhaud G, Dani C (2006) Autocrine fibroblast growth factor 2 signalling is critical for self-renewal of human multipotent adipose-derived stem cells. Stem Cells 24:2412–2419
37. Xiao L, Sobue T, Esliger A et al (2010) Disruption of the Fgf2 gene activates the adipogenic and suppresses the osteogenic program in mesenchymal marrow stromal stem cells. Bone 47:360–370
38. Kume S, Kato S, Yamagishi S et al (2005) Advanced glycation end-products attenuate human mesenchymal stem cells and prevent cognate differentiation into adipose tissue, cartilage, and bone. J Bone Miner Res 20:1647–1658
39. Van Tienen FHJ, van der Kallen CJH, Lindsey PJ, Wanders RJ, van Grevenbroek MM, Smeets HJM (2011) Preadypocytes of type 2 diabetes subjects display an intrinsic gene expression profile of decreased differentiation capacity. Int J Obes 35:1154–1164
40. Gopalakrishnan V, Vignesh RC, Arunakaran J, Aruldhas MM, Srinivasan N (2006) Effects of glucose and its modulation by insulin and estradiol on BMSC differentiation into osteoblastic lineages. Biochem Cell Biol 84:93–101
41. Aguiari P, Leo S, Zavan B et al (2008) High glucose induces adipogenic differentiation of muscle-derived stem cells. PNAS 105: 1226–1231
42. Bicknell R, Harris AL (2004) Novel angiogenic signalling pathways and vascular targets. Annu Rev Pharmacol Toxicol 44:219–238
43. Zerlin M, Julius MA, Kitajewski J (2008) Wnt/Frizzled signalling in angiogenesis. Angiogenesis 1:63–69
44. Phng LK, Gerhardt H (2009) Angiogenesis: a team effort coordinated by Notch. Dev Cell 16:196–208
45. Limbourg A, Ploom M, Elligsen D et al (2007) Notch ligand delta-like 1 is essential for postnatal arteriogenesis. Circ Res 100:363–371
46. Benedito R, Roca C, Sörensen I et al (2009) The Notch ligands Dll4 and Jagged1 have opposing effects on angiogenesis. Cell 137:1124–1135
47. Dejana E (2010) The role of Wnt signalling in physiological and pathological angiogenesis. Circ Res 107:943–952
48. Zhang B, Ma J (2010) Wnt pathway antagonists and angiogenesis. Protein Cell 1:898–906
49. Chang YJ, Shih DT, Tseng CP, Hsieh TB, Lee DC, Hwang SM (2006) Disparate mesenchyme-lineage tendencies in mesenchymal stem cells from human bone marrow and umbilical cord blood. Stem Cells 24:679–685
50. Scheller EL, Song J, Dishowitz MI, Soki FN, Hankenson KD, Krebsbach PH (2010) Leptin functions peripherally to regulate differentiation of mesenchymal progenitor cells. Stem Cells 28:1071–1080

SUPPLEMENTARY MATERIAL

ESM Methods

1.1 Animals

Rats were maintained in a controlled environment (20.0-22.0 ºC, 60 % relative humidity and light on from 07:00 to 19:00) and were fed with LabDiet®5008 chow (Panlab, Barcelona, Spain) *ad libitum*. Rat weights and blood glucose levels were recorded weekly in all animals (ESM Fig. 1). 14 weeks old rats were anesthetized with a combination of ketamine and medetomidine (75 mg/kg and 0.5 mg/kg; i.p.), and then killed by exsanguination. Immediately, subcutaneous adipose tissue (SAT) was dissected, frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C or processed for ASCs isolation.

1.2 Isolation and culture of ASCS

SAT was washed, minced and digested at 37°C for 30 min with type I collagenase solution (1 mg/ml; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). The digested tissue was centrifuged at 1200 rpm for 10 min to obtain the stromal vascular fraction (SVF). The SVF was resuspended in DMEM (Gibco, Life Technologies, Grand Island, NY, USA) supplemented with 10% FBS (Biological Industries, Kibbutz Beit-Haemek, Israel) and 1% penicillin/streptomycin (Gibco, Life Technologies), filtered through a 100 μm mesh and seeded. After 24 hours nonadherent cells were removed and the medium replaced. Adherent cells were referred as ASCs. Cells were expanded (37ºC with 5% CO_2) and maintained at subconfluent levels. All analysis was performed at passages 3 (P3).

1.3 Flow cytometry

Freshly collected SVF and cultured ASCs were characterized by flow cytometry, as reported previously [1]. We analyzed the presence of ASCs surface markers CD29, CD44 and CD90 and CD45 was used as a marker of hematopoietic cells. Cells were suspended in flow cytometry buffer (FCB) (PBS, 2% BSA, 0.1% sodium azide). Cell aliquots (5 x 10^5 cells) were incubated for 30 min at 4°C with PerCP-conjugated monoclonal antibody against CD90 (Clone OX-7, BD Biosciences, San Diego, CA, USA), RPE-conjugated monoclonal antibody against CD44 (Clone OX-50, AbD Serotec, Kidlington, UK), FITC-conjugated monoclonal antibody against CD29 (Clone Ha2/5, BD Biosciences) and FITC-conjugated monoclonal antibody against CD45 (Clone OX-1, BD Biosciences). Isotype-identical antibodies (BD Biosciences) were used as controls. After two washes with cold FCB, a total of 50000 events were analyzed by fluorescence-activated

cell sorting (FACS) using a Beckman Coulter Epics XL instrument and Expo 32 ADC XL 4 color software (**Beckman Coulter Inc., France**).

1.4 *In vitro* ASCs viability

Cell viability was evaluated by using the colorimetric 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt (MTS) assay (CellTiter 96® AQ_{ueous} One Solution Cell Proliferation Assay; Promega Corporation, Madison, WI, USA) according to the manufacturer's instructions. ASCs (5 x 10^3 cells) were seeded on 96-well plates and, after 24 hours in culture, viability was assessed with optical density measurements at 490 nm (SpectraMax 250; Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA).

1.5 Detection of apoptosis

ApopTag®Red *in Situ* Apoptosis Detection Kit (Chemicon International Inc., Temecula, CA, USA) was performed for detection of apoptotic nuclei according to manufacturer's instructions. The results were analyzed using inverted fluorescence confocal microscope (Leica TCS SP2-AOBS, Wetzlar, Germany). Randomly selected microscopic fields (n=3) were evaluated to calculate the ratio of positive cells by specific staining to total cells.
Furthermore, quantification of apoptotic cells was performed using an Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit (BD Biosciences) according to the manufacturer's instructions. Analyses were performed by FACS. The cells in the FITC-positive and Propidium Iodide-negative fraction were regarded as apoptotic cells.

1.6 Rat Stem Cell PCR Array

Total RNA from SVF was extracted using RNeasy mini isolation kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. cDNA was synthesized from 0.5 μg total RNA using RT^2 First Strand Kit (SABiosciences, Frederick, MD, USA) and analyzed by a specific Rat Stem Cell PCR Array (SABiosciences) according to manufacturer's protocols. Data analysis was performed using PCR array Data Analysis Web Portal (http://www.SABiosciences.com/pcrarraydataanalysis.php).

1.7 *In vitro* ASCs differentiation

Adipogenic differentiation ASCs were seeded at a density of 1.5 x 10^4 cells/cm^2 and allowed to grow to confluence. Subsequently, cells were allowed to differentiate for 21 days in the adipogenic medium containing 0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine, 1 μM dexamethasone, 100 μM indomethacin and 10 μg/ml insulin. All chemicals were obtained from Sigma-Aldrich. At the end of

the culture, differentiation potency was evaluated microscopically by Herxheimer staining and lineage specific gene expression pattern (peroxisome proliferator activated receptor □: *Ppar*□, lipoprotein lipase: *Lpl*, fatty acid binding protein 4: *Fabp4* and *Cd36*) by real time PCR.

Osteogenic differentiation ASCs were seeded at a density of 1.5 x 10^4 cells/cm^2 and induced with osteogenic medium containing 2 mM □-glycerophosphate disodium, 10^{-7} M dexamethasone, 50 □g/ml ascorbic acid and 0.15 mM sodium phosphate for 21 days. All chemicals were obtained from Sigma-Aldrich. At the end of the culture, Alizarin red staining and *osteopontin*, *alkaline phosphatase* (*Alp*) and *osteocalcin* expression by real time PCR were analyzed to detect osteogenic differentiation of ASCs.

Endothelial cell differentiation ASCs were seeded at a density of 5 x 10^3cells/cm^2 and induced with endothelial cell (EC) differentiation medium (M-199 supplemented with 10 ng/□l basic fibroblast growth factor (FGF) (BD Biosciences) and 50 ng/□l vascular endothelial growth factor (VEGF) (Sigma-Aldrich) for 7 days. The acquisition of the EC phenotype was evaluated in Matrigel (BD Biosciences) *in vitro* tube formation assay and specific EC markers expression (platelet endothelial cell adhesion molecule 1: *Pecam-1* and *Cd105*). Total length of tubular structures was quantified with ImageJ 1.44p software (NIH, USA).

1.8 Haemoglobin assessment

Haemoglobin content of Matrigel plugs was analyzed using the Drabkin's method. Plugs were homogenized in 250 □l of PBS containing 0.1% Brij-35 (Sigma-Aldrich) using electric homogeneizer following by centrifugation at 5000 g for 5 min. The supernatant was used in duplicate to measure haemoglobin by adding Drabkin's reagent (Sigma-Aldrich). The sample was incubated at room temperature for 5 min and absorbance at 540 nm was measured using spectrophotometer (SpectraMax 250; Molecular Devices).

1.9 Immunofluorescence staining

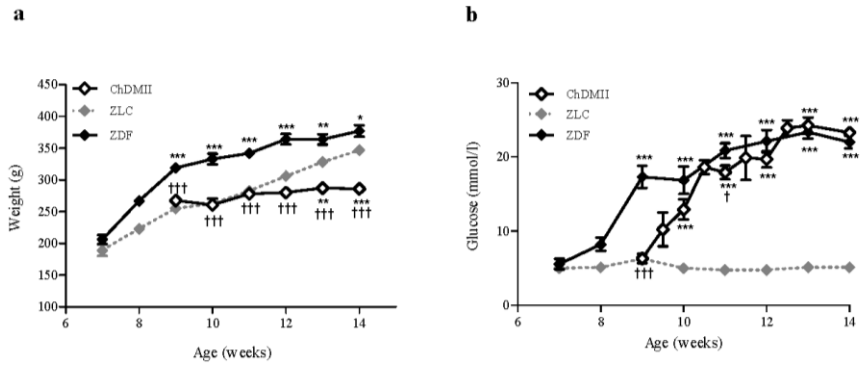
Blood vessels were visualized by immunofluorecent staining. Matrigel plugs were fixed in 4% paraformaldehyde and embedded in OCT. 10 □m thick frozen Matrigel plug sections were prepared for immunostaining. We used rabbit anti-rat von Willebrand factor (vWF) (1:50) (Dako, Glostrup, Denmark), this was followed by incubation with Alexa 488-conjugated goat anti-rabbit antibody (1:100) (Molecular Probes, Carlsbad, CA, **USA**). Cell nuclei were counterstained with Hoechst 33342 (1:1000) (Molecular Probes). Samples were covered with Prolong Gold antifade reagent (Molecular Probes). Images were recorded on a

Leica inverted fluorescence confocal microscope. Cells were viewed with HCX PL APO 63x/1.2 W Corr/0.17 CS objective. Fluorescent images were acquired in a scan format of 1.024 x 1.024 pixels in a spatial data set (xyz) and were processed with the Leica Standard Software TCS-AOBS. Controls with no primary antibody showed no fluorescence labelling.

ESM References

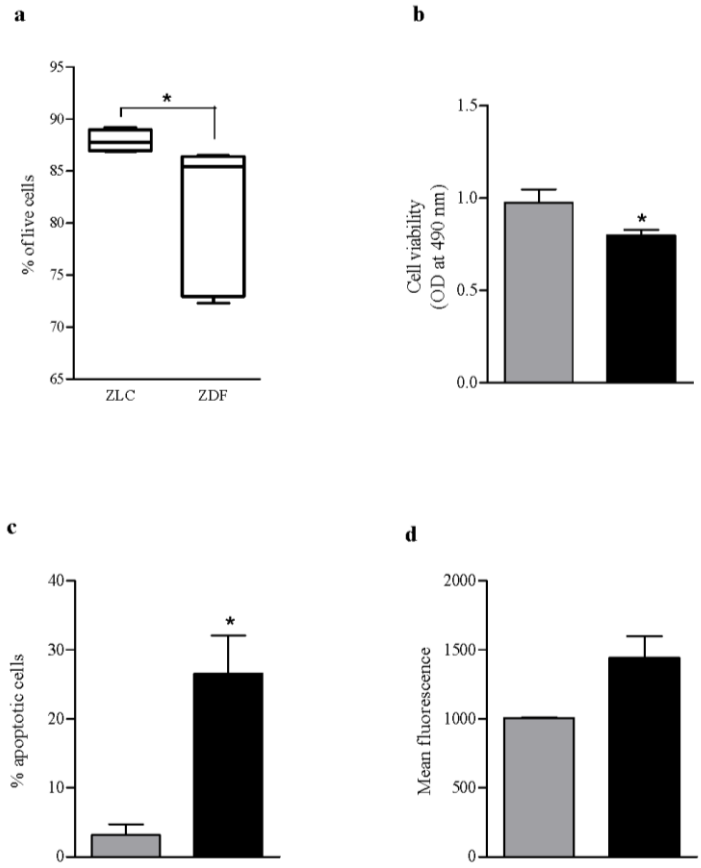
1 Miyahara Y, Nagaya N, Katsoka M, et al (2006) Monolayered mesenchymal stem cells repair scarred myocardium after myocardial infarction. Nat Med 12(4): 459-465.

ESM Fig. 1

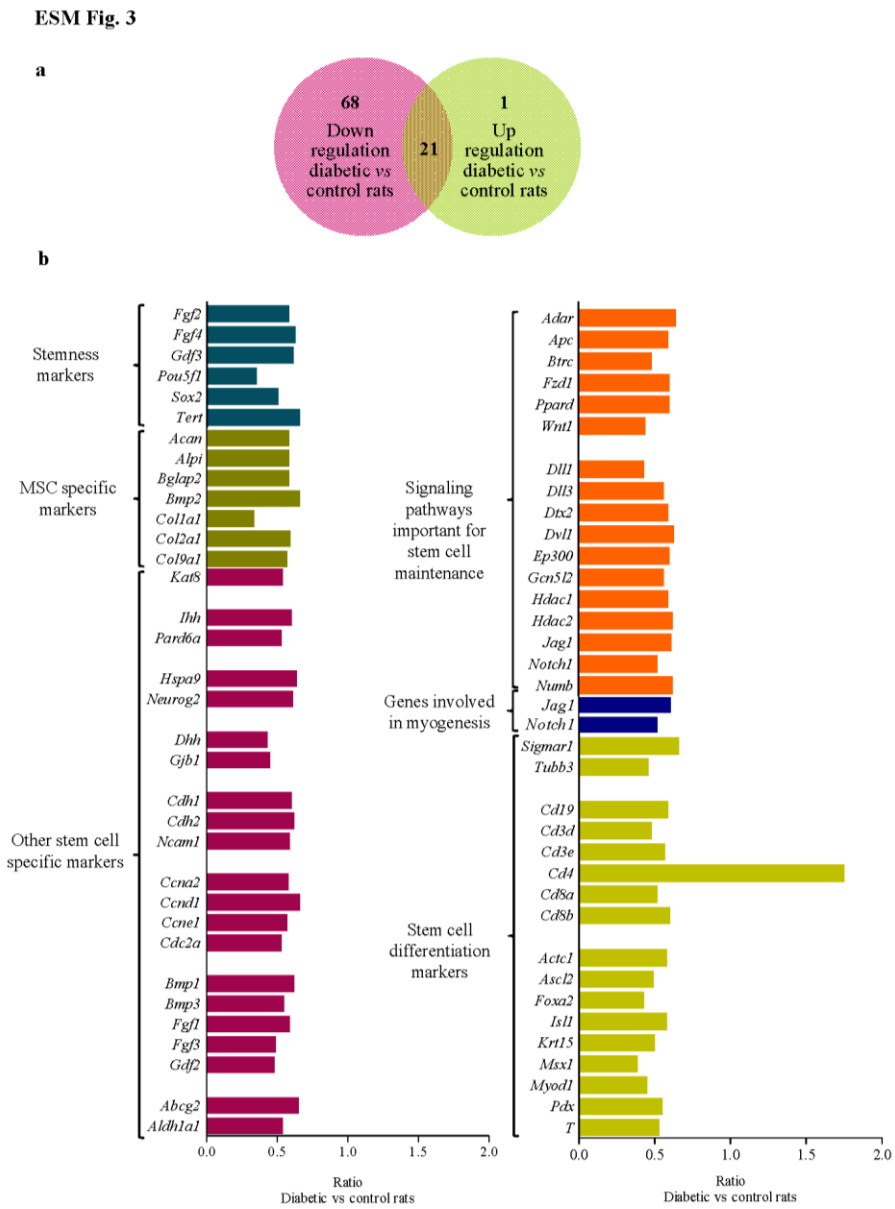


ESM Fig. 1 Rat weights **(a)** and fasting blood glucose levels **(b)** were recorded weekly in all animals. The data are the mean ± SEM (n = 5-8 per group). Grey diamonds, ZLC; black diamonds, ZDF; white diamonds, ChDMII. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ vs ZLC. † $p < 0.05$ and ††† $p < 0.001$ vs ZDF.

ESM Fig. 2



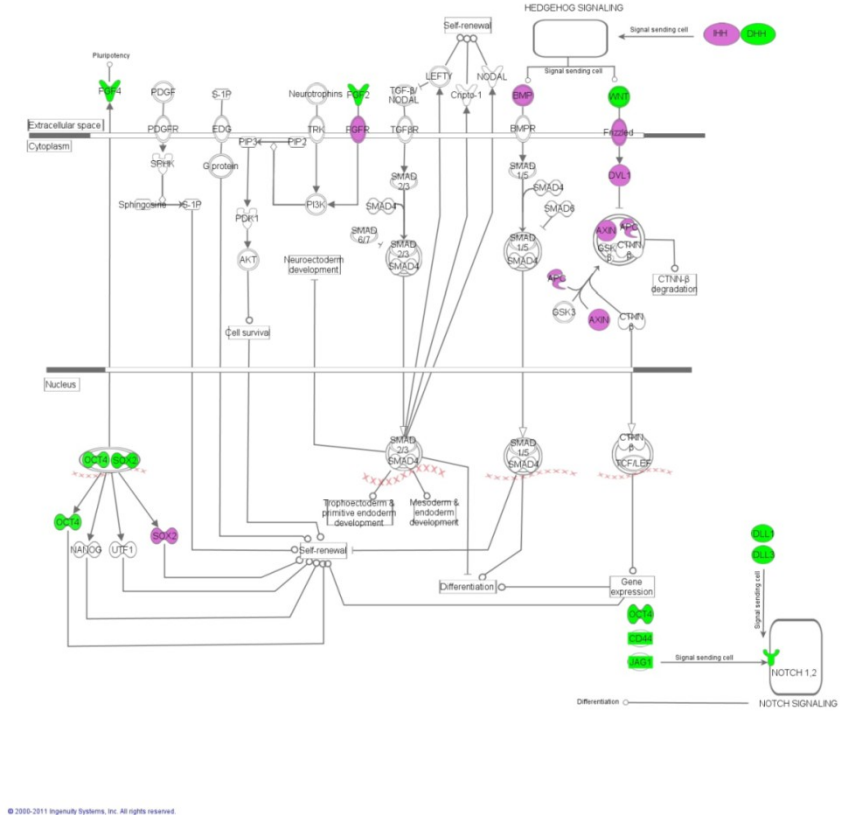
ESM Fig. 2 In vitro ASC viability. (a) Determination of live cells by flow cytometric analysis (n = 5 per group). **(b)** The number of viable cells in proliferation of ASCs cultures was evaluated using a colorimetric MTS assay. (n = 3-4 per group, in technical triplicates).**(c)** Detection of apoptotic nuclei using ApopTag®Red in Situ Apoptosis detection Kit (n = 3 per group, in technical triplicates). **(d)** Quantification of apoptotic cells using an Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit (n = 3 per group). Grey bars, ZLC; black bars, ZDF. The data are the mean ± SEM. * $p < 0.05$ for ZDF vs ZLC.



ESM Fig. 3Gene expression profile of the SVF. Gene expression was analyzed by a specific Rat Stem Cell PCR Array that profiles the expression of genes related to identification, growth and differentiation of stem cells. Each data point was normalized according to Rpl13a, ribosomal protein large P1, hypoxanthine phosphoribosyltransferase and lactate dehydrogenase A expression levels and is presented as the ratio ZDF vs ZLC. (a) Venn diagram illustrates the number of genes analyzed. Of 91 gene interrogated, gene expression analysis identified a

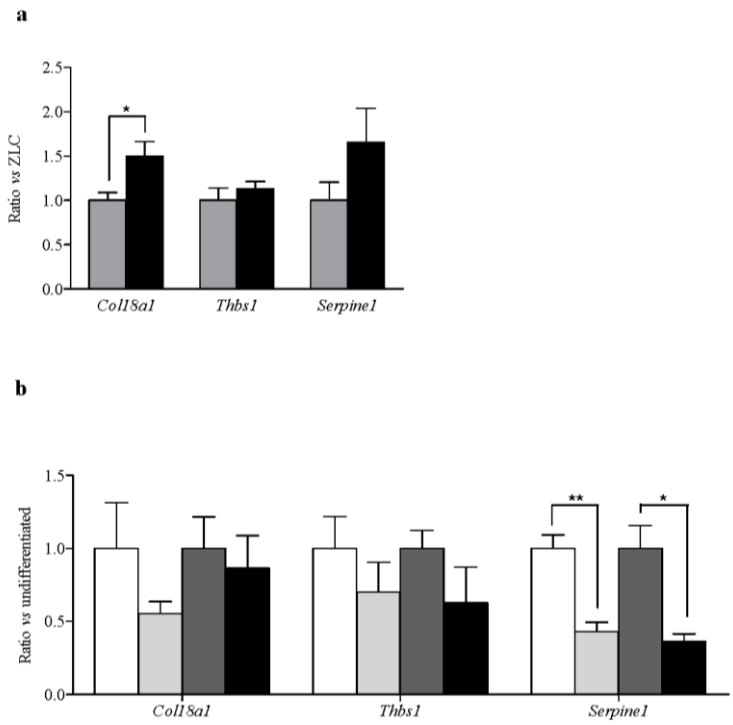
cluster of 69 genes that were differentially expressed between control and diabetic SVF; 68 genes were down-regulated, 21 genes were not modified (intersection) and only 1 gene showed increased expression in diabetic vs control SVF. (b) Diabetes was associated with an overall down regulation of stem cell specific markers in SVF. Mesenchymal stem cell specific markers, genes involved in signalling pathways important for stem cell maintenance and genes that defines the stemness of these cells and that maintain their pluripotency and selfrenewal characteristics showed a reduced expression in the SVF from diabetic rats.

ESM Fig. 4



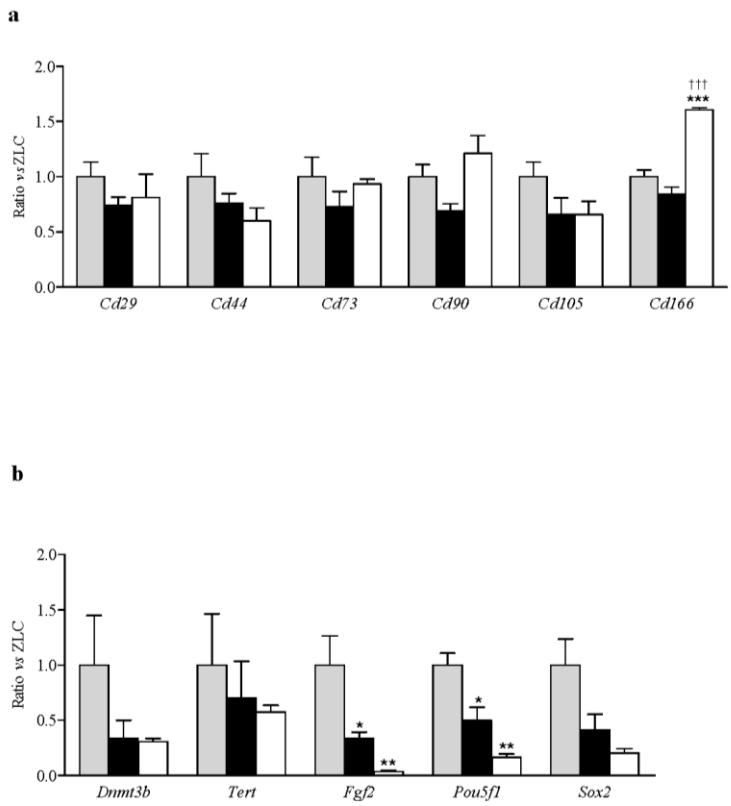
ESM Fig. 4Modified stem cell pluripotency canonical pathway. Schematic overview of the main molecules involved in the maintenance of pluripotent state and self-renewal in stem cells. Diabetes is associated with a reduced expression of the colored molecules. Green indicates molecules analyzed in SAT, SVF and ASCs. Purple indicates molecules only analyzed in SVF. Modified diagram was performed using IPA software (Ingenuity System Inc, www.ingenuity.com

ESM Fig. 5



ESM Fig. 5Expression of anti-angiogenic factors of ASCsZDFand ASCsZLC. (a) Expression in ASCs cultured after three passages. Each data point was normalized according to Rplp0 and Rpl13a expression levels and is presented as the ratio ASCsZDF vs ASCsZLC (n = 5-6 per group, in technical duplicates). Grey bars, ASCsZLC; black bars, ASCsZDF. (b) Expression in differentiated or undifferentiated ASCs towards endothelial cells. Each data point was normalised according to the Rplp0 expression level and is presented as the ratio vs undifferentiated cells (n = 5-6 per group, in technical duplicates). White bars, undifferentiated ASCsZLC; dark grey bars, undifferentiated ASCsZDF; light grey bars, differentiated ASCsZLC; black bars, differentiated ASCsZDF. * $p < 0.05$ for ZDF vs ZLC. † $p < 0.05$ and †† $p < 0.01$ for differentiated vs undifferentiated cells.

ESM Fig. 6



ESM Fig. 6Gene expression profile of ASCs from ChDMII rats. Expression of stem cell specific markers was analyzed by real time PCR. Each data point was normalized according to Rplp0 and Rpl13a expression levels and is presented as the ratio vs ASCsZLC (n = 4-6 per group, in technical duplicates). Grey bars, ASCsZLC; black bars, ASCsZDF; white bars, ASCsChDMII. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ vs ASCsZLC. ††† $p < 0.001$ vs ASCsZDF.

ESM Table 1. List of TaqMan gene expression assays, primers and probes used for real time PCR

Gene symbol	Taq Man gene expression assays reference
Cd29	*Rn00566727_m1*
Cd44	*Rn00563924_m1*
Cd73	*Rn00665212_m1*
Cd90	*Rn00562048_m1*
Cd105	*Rn01438763_m1*
Cd166	*Rn00582112_m1*
Col1a1	*Rn01463848_m1*
Dnmt3b	*Rn01536414_g1*
Fgf2	*Rn00570809_m1*
Fgf4	*Rn00709728_m1*
Pou5f1	*Rn01532129_g1*
Sox2	*Rn01286286_g1*
Tert	*Rn01409454_m1*
Podxl	*Rn00593804_m1*
Dll1	*Rn00583276_m1*
Dll3	*Rn00586568_m1*
Jag1	*Rn00569647_m1*
Notch1	*Rn01758633_m1*
Notch2	*Rn00577522_m1*
Wnt1	*Rn01761722_m1*
Dhh	*Rn01761787_m1*
Cxcl12	*Rn00573260_m1*
Cxcr4	*Rn01483207_m1*
Lpl	*Rn00561482_m1*
Fabp4	*Rn00670361_m1*
Cd36	*Rn01442640_g1*
Osteopontin	*Rn00681031_m1*
Alp	*Rn00564931_m1*
Osteocalcin	*Rn01455285_g1*
Endostatin	*Rn01428995_m1*
Thbs1	*Rn01513693_m1*
SerpinE1	*Rn01481341_m1*
Rplp0	*Rn00821065_g1*
Rpl13a	*Rn00821946_g1*

Gene symbol	Forward primer (5'-3')	Probe	Reverse primer (5'-3')
Pecam-1	*gccaagccatccaattgtaaa*	*ctcctgccttgttaatgt*	*aaacagcgcctcccattct*
*Pparγ**	*aacccaactctacaacaggccaca*		*agcttcaatcggatggttcttcgg*

*Pparγ expression was analyzed using SyBR green fluorescence detection.

ESM Table 2. Metabolic profile

	ZLC	ZDF	ChDMII	p-value
Glucose (mmol/l)	5.13 ± 0.11	21.80 ± 0.64***	23.29 ± 0.46***	< 0.0001
Total cholesterol (mmol/)	2.43 ± 0.20	5.12 ± 0.33***	2.92 ± 0.14†††	< 0.0001
HDL cholesterol (mmol/l)	0.79 ± 0.26	1.97 ± 0.99	2.07 ± 0.07	ns
Triacylglycerols (mmol/l)	1.35 ± 0.15	9.68 ± 1.05***	3.93 ± 0.20†††	< 0.0001
Urea (mmol/l)	17.25 ± 1.12	21.12 ± 0.40*	15.17 ± 0.59†††	0.0005
Protein (g/l)	73.83 ± 4.00	79.50 ± 6.35	125.20 ± 5.79†††***	< 0.0001
GOT(u/l)	74.82 ± 8.50	82.81 ± 18.43	85.07 ± 6.18	ns
GPT (u/l)	40.61 ± 2.65	74.99 ± 12.75*	89.11 ± 4.74**	0.0033
Creatinine (µmol/l)	46.90 ± 7.91	44.61 ± 5.88	43.01 ± 1.85	ns

The data are the mean ± SEM (n = 5-8 per group). ns: not statistically significant. * *vs* ZLC, † *vs* ZDF.

ESM Table 3. Phenotypic characterization by flow cytometric analysis

a

SVF			
Surface marker (%)	**ZLC**	**ZDF**	**p-value**
CD90$^+$	4.08 ± 0.39	3.96 ± 0.18	ns
CD44$^+$	3.04 ± 0.12	3.14 ± 0.12	ns
CD45$^+$	4.34 ± 0.22	5.72 ± 0.96	ns

b

ASCs			
Surface marker (%)	**ZLC**	**ZDF**	**p-value**
CD90$^+$	94.51 ± 1.25	94.92 ± 1.08	ns
CD44$^+$	43.96 ± 3.38	59.61 ± 12.63	ns
CD29$^+$	96.64 ± 1.76	92.94 ± 1.75	ns
CD45$^+$	0.19 ± 0.01	0.18 ± 0.01	ns

Surface markers were analyzed in the stromal vascular fraction (SVF) **(a)** and adipose-derived stem cells (ASCs) cultured after three passages **(b)**. The data are the mean ± SEM (n = 5 per group). ns: not statistically significant.

ARTÍCULO 3

"Inhibition of Notch rescues the angiogenic potential impaired by cardiovascular risk factors in epicardial adipose stem cells"

Maria Teresa Bejar[1], Raquel Ferrer-Lorente[1], Esther Peña[1], Lina Badimon[1,2]

[1]Cardiovascular Research Center, CSIC-ICCC , Hospital de la Santa Creu i Sant Pau (UAB), Barcelona, Spain.

[2]Cardiovascular Research Chair, UAB, Barcelona, Spain.

Publicado en: The FASEB Journal. 2016 Aug; 30(8):2849-59.

Factor de impacto (2015): 5.299

RESUMEN

La inhibición de Notch rescata el potencial angiogénico afectado por los factores de riesgo cardiovascular en las células madre derivadas de tejido adiposo epicárdico

El tejido adiposo epicárdico es un reservorio de células madre (ASC) con efectos aún desconocidos sobre la homeostasis del miocardio y las arterias coronarias. El objetivo de este estudio es investigar la función angiogénica de las ASC de tejido adiposo epicárdico y como ésta puede verse afectada por la presencia de factores de riesgo cardiovascular.

El tejido adiposo epicárdico se obtuvo de un modelo animal con acumulación de factores de riesgo cardiovascular (FRCV): ratas Zucker diabetic fatty, y de ratas control sanas sin FRCV. Las ASC se aislaron, y su función se analizó mediante ensayos de proliferación, diferenciación, citometría de flujo, expresión génica y análisis de angiogénesis *in vivo*. Las ASC de ambos grupos mostraron tener capacidad de diferenciación a los linajes osteogénico y adipogénico. Sin embargo, las ASC provenientes de animales con FRCV mostraron una menor habilidad para formar estructuras tubulares *in vitro* después de la diferenciación endotelial, así como un potencial angiogénico reducido *in vivo* comparado con las ASC de animales control. Además, las ASC

de ratas con FRCV mostraron una mayor expresión de los genes diana de la vía de señalización Notch Hes7, Hey1 y HeyL en comparación con las del grupo control. La inhibición de la vía de señalización Notch, mediante el condicionamiento de las ASC con un inhibidor de gamma-secretasas, indujo una reducción de la expresión de los genes Hes/Hey y recuperó la función angiogénica *in* vivo de las ASC de animales con FRCV.

En este estudio mostramos por primera vez el impacto de la acumulación de FRCV en las ASC del tejido adiposo epicárdico, que la pérdida de función angiogénica es en parte causada por un incremento en la señalización de Notch y que el condicionamiento de las ASC mediante el bloqueo de la vía de señalización Notch rescata su potencial angiogénico.

THE FASEB JOURNAL • RESEARCH • www.fasebj.org

Inhibition of Notch rescues the angiogenic potential impaired by cardiovascular risk factors in epicardial adipose stem cells

Maria Teresa Bejar,* Raquel Ferrer-Lorente, Esther Peña, and Lina Badimon[1]

*Cardiovascular Research Center, Consejo Superior de Investigaciones Cientificas–Institut Català de Ciències Cardiovasculars, Institut d'Investigació Biomèdica Sant Pau, Barcelona, Spain

ABSTRACT: The epicardial adipose tissue (EAT) is a reservoir of adipose-derived stem cells (ASCs), with as yet unknown effects on myocardial and coronary arteries homeostasis. The purpose of this study was to investigate the angiogenic function of epicardial ASCs and their regulation by the common cardiovascular risk factors (CVRFs) affecting heart disease. Epicardial fat was obtained from a rodent model with clustering of CVRFs (Zucker diabetic fatty) rats (ZDF-Lepr^{fa}) and from their control littermates (ZDF-lean-crl) without CVRFs, ASCs were isolated, and their function was assessed by proliferation and differentiation assays, flow cytometry, gene expression, and *in vivo* Matrigel angiogenesis analysis. Epicardial ASCs from both groups showed adipogenic and osteogenic differentiation capacity; however, epicardial ASCs from CVRF animals had a lesser ability to form tubular structures *in vitro* after endothelial differentiation, as well as a reduced angiogenic potential *in vivo* compared to control animals. Epicardial ASCs from CVRF rats showed up-regulation of the downstream Notch signaling genes *Hes7*, *Hey1*, and *Heyl* compared with control animals. The inhibition of Notch signaling by conditioning epicardial ASCs from CVRF animals with a γ-secretase inhibitor induced a reduction in Hes/Hey gene expression and rescued their angiogenic function *in vivo*. We report for the first time the impact of CVRF burden on the ASCs of EAT and that the defective function is in part caused by increased Notch signaling. Conditioning ASCs by blocking Notch signaling rescues their angiogenic potential.—Bejar, M. T., Ferrer-Lorente, R., Peña, E., Badimon, L. Inhibition of Notch rescues the angiogenic potential impaired by cardiovascular risk factors in epicardial adipose stem cells. FASEB J. 30, 000–000 (2016). www.fasebj.org

KEY WORDS: angiogenesis · ZDF · epicardial adipose tissue · Hes/Hey family · differentiation

Clustering of cardiovascular risk factors (CVRFs), hypercholesterolemia, hyperglycemia, and obesity-associated subclinical inflammation induces a chronic metabolic disturbance with implications in diverse cells and organ function, including vascular dysfunction, affecting the vascular system from microvessels to arteries (1). Hyperglycemia in the presence of other metabolic risk factors increases the absolute risk of coronary events (2, 3).

Epicardial adipose tissue (EAT) is a thoracic fat depot of great interest because of its proximity to the myocardium and coronary arteries (4). Recent studies showed a correlation between the amount of EAT and coronary artery disease (CAD), often in the presence of CRVFs, such as obesity or type 2 diabetes (5, 6). The endocrine role exerted by EAT (7) is widely recognized, and it has been suggested that dysregulation of adipokine secretion is involved in CAD (8, 9).

Adipose tissue, besides containing adipocytes, fibroblasts, pericytes, endothelial cells, and macrophages, is a source of mesenchymal stem cells (MSCs). Adipose-derived stem cells (ASCs) stimulate angiogenesis-promoting progenitor cell differentiation and paracrine proangiogenic and immunomodulatory effects (10). However, little is known about epicardial ASCs and their contribution to cardiac cell function or to the endogenous repair process after ischemic injury. Angiogenesis is essential for repair of wounded or ischemic organs, and insufficient angiogenic switch in ischemic heart disease limits revascularization, healing, and regeneration (11).

We have reported previously that subcutaneous adipose-tissue–resident ASCs, in both humans and in rats are functionally affected by CVRFs (12, 13). Particularly

ABBREVIATIONS: ASC, adipose-derived stem cell; CAD, coronary artery disease; CVRF, cardiovascular risk factors; DAPT, *N*-[*N*-(3,5-difluorophenacetyl-L-alanyl)]-*S*-phenylglycine *t*-butyl ester; EAT, epicardial adipose tissue; FACS, fluorescence-activated cell sorting; FBS, fetal bovine serum; FCB, flow cytometry buffer; MSC, mesenchymal stem cell; MTS, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfopheny)-2*H*-tetrazolium; PDGF, platelet-derived growth factor; SVF, stromal vascular fraction; ZDF, Zucker diabetic fatty

[1] Correspondence: Cardiovascular Research Center, C/Sant Antoni Maria Claret 167, 08025 Barcelona, Spain. E-mail: lbadimon@csic-iccc.org

doi: 10.1096/fj.201600204R

This article includes supplemental data. Please visit *http://www.fasebj.org* to obtain this information.

the ASCs in the subcutaneous fat are committed to the adipogenic lineage, and their proliferation rate and proangiogenic potential are impaired (13, 14).

The purpose of this study was to investigate whether the ASCs in epicardial fat depots are functionally affected by CVRFs and whether the functional impairment can be rescued.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Male ZDF-Lepr^{fa} (obese, hyperlipidemic, and type-2 diabetic) rats were chosen as a model of CVRF clustering (n = 10), and ZDF-crl (lean nondiabetic) rats (n = 10) were used as controls. The animals were purchased from Charles River Laboratories (Saint-Germain-Nuelles, France) and were maintained in a controlled environment (20.0–22.0°C; 60% relative humidity and lights on from 0700 to 1900 h) and were fed LabDiet 5008 chow (Panlab, Barcelona, Spain) *ad libitum*. Rat weights and cholesterol and glucose levels were recorded weekly. Biochemical parameters are reported in Supplemental Table S1. Fourteen-wk-old rats were anesthetized with a combination of ketamine and medetomidine (75 and 0.5 mg/kg, i.p., respectively) and killed by exsanguination. The animals were subjected to a thoracotomy, the pericardium was completely removed, the heart was extracted from the thoracic cavity, and the EAT attached to the heart was immediately dissected and processed for stromal vascular fraction (SVF) and ASC isolation.

All procedures used in the study fulfilled the criteria of the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* [National Institutes of Health (NIH), Bethesda, MD, USA] and were approved by the Internal Animal Committee Review Board of the Cardiovascular Research Center (CSIC-ICCC, Barcelona, Spain).

Epicardial ASC isolation and culture

EAT was washed with sterile PBS supplemented with 100 U/ml penicillin and 100 μg/ml streptomycin (Thermo Fisher Scientific, Grand Island, NY, USA). Once the weight was determined, the tissue was minced into a type I collagenase solution (1 mg/ml; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and was incubated for 30 min in a 37°C prewarmed orbital shaker. Collagenase activity was neutralized with an equal volume of DMEM (Thermo Fisher Scientific) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Biologic Industries, Kibbutz Beit-Haemek, Israel) and 1% penicillin/streptomycin, and the suspension was centrifuged at 1200 rpm for 10 min to obtain SVF. The pellet was resuspended in the medium described above and filtered through a 100 μm mesh to eliminate the remaining tissue fragments. Isolated SVF cells were counted and either analyzed or placed in 25 cm^2 culture flasks. After 24 h, nonadherent cells were removed and the medium replaced. The cells were expanded in a humidified environment at 37°C with 5% CO_2 and maintained at subconfluent levels before phenotypic profile analysis. The identity of the ASCs was defined by using the following criteria: adherence to plastic, cell surface antigen phenotyping, and multipotent differentiation potential. All analyses were performed at passage 3.

Flow cytometry

Surface-specific MSC markers were analyzed in ASCs at passage 3 by flow cytometry. The cells were suspended in flow cytometry buffer (FCB) (PBS; 0.1% bovine serum albumin and 0.1% sodium azide). Cell aliquots (1×10^5 cells) were incubated for 30 min at 4°C with PerCP-conjugated monoclonal antibody against CD90 (Clone OX-7; BD Biosciences, San Diego, CA, USA), RPE-conjugated monoclonal antibody against CD44 (Clone OX-50; AbD Serotec, Kidlington, United Kingdom), FITC-conjugated monoclonal antibody against CD29 (Clone Ha2/5; BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) and FITC-conjugated monoclonal antibody against CD45 (Clone OX-1; BD Biosciences). Isotype-identical antibodies (BD Biosciences) were used as controls. After 2 washes with cold FCB, 50,000 events were analyzed by fluorescence-activated cell sorting (FACS) on a Coulter Epics XL instrument with Expo 32 ADC XL 4-color software (Beckman Coulter, Jersey City, NJ, USA).

TABLE 1. *TaqMan gene expression assay probes used in RT-PCR*

Gene symbol	TaqMan gene expression assays reference
Alpl	*Rn00564931_m1*
Bglap (osteocalcin)	*Rn01455285_g1*
Cd36	*Rn01442640_g1*
Dnmt3b	*Rn01536414_g1*
Fabp4	*Rn00670361_m1*
Fgf2	*Rn00570809_m1*
Kdr	*Rn00564986_m1*
Lpl	*Rn00561482_m1*
Nanog	*Rn01462825_m1*
Pecam1	*Rn01467262_m1*
Podxl	*Rn00593804_m1*
Pou5f1	*Rn01532129_g1*
Rplp0	*Rn00821065_g1*
Serpine1	*Rn01481341_m1*
Sox2	*Rn01286286_g1*
Spp1 (osteopontin)	*Rn00681031_m1*
Tert	*Rn01409454_m1*
Thbs1	*Rn01513693_m1*
Vwf	*Rn01492147_m1*

Cell proliferation

Cell proliferation was determined by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfopheny)-2*H*-tetrazolium (MTS) assay (CellTiter 96 Aqueous One Solution cell proliferation assay kit; Promega, Madison, WI, USA). In this assay, MTS tetrazolium is converted to formazan (490 nm absorbance) by metabolically active cells. The cells (5×10^3) were seeded in a 96-well plate, and 24 h later, 10 μl MTS per well was added and incubated for 2 h. The absorbance was then quantified.

Transcriptomic analysis

Total RNA was isolated from SVF and ASCs with the RNeasy mini-isolation kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) used according to the manufacturer's instructions. Isolated total RNA was reverse transcribed into cDNA with a High Capacity cDNA Archive kit (Thermo Fisher Scientific). mRNA levels were analyzed by real-time PCR using TaqMan gene expression assays and the Prism 7900HT Sequence Detection System (all from Thermo Fisher Scientific) according to the manufacturer's instructions. An Absolute quantification method by standard curve was used. All expression analyses were normalized with ribosomal protein (*Rplp0*). Gene expression data are expressed as target gene mRNA expression relative to housekeeping gene *Rplp0* expression. TaqMan gene expression assays are provided in **Table 1**. Specific Notch-related gene expression in ASCs was

analyzed by a specific PCR array (Rat Notch Signaling Pathway PCR Array; Qiagen, Hilden, Germany). To analyze the results obtained, we used RT^2 Profiler PCR Array Data Analysis Template v4.0 Software (Qiagen). A 1.5-fold change threshold was applied to select differentially expressed genes.

In vitro epicardial ASC differentiation

Adipogenic differentiation

ASCs were seeded at a density of 1.5×10^4 cells/cm^2 in 6-well plates and allowed to grow to confluence. Subsequently, the cells were allowed to differentiate for 21 d in adipogenic medium containing 0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine, 1 μM dexamethasone, 100 μM indomethacin, and 10 μg/ml insulin. All chemicals were obtained from Sigma-Aldrich. Differentiation was evaluated by Herxheimer staining and lineage-specific gene expression pattern (*Lpl*, *Fabp4*, and *Cd36*) by real-time PCR.

Osteogenic differentiation

ASCs were seeded at a density of 1.5×10^4 cells/cm^2 in 6-well plates and induced with osteogenic medium containing 2 mM β-glycerophosphate disodium, 10^{-7} M dexamethasone, 50 μg/ml ascorbic acid, and 0.15 mM sodium phosphate for 21 d. All chemicals were obtained from Sigma-Aldrich. Differentiation was evaluated by Alizarin red staining and lineage-specific gene expression by real-time PCR (*Spp1*, *Bglap*, and *Alpl*).

Endothelial differentiation

ASCs were seeded at a density of 5×10^3 cells/cm^2 in 6-well plates. They were allowed to grow to 80% confluence, and differentiation was induced with endothelial cell growth medium-2 (BulletKit; Lonza Group, Walkersville MD, USA) for 1 wk. Differentiation was evidenced by a Matrigel-based (BD Biosciences) angiotube formation assay (15) and by real-time PCR determination of *Kdr*, *Vwf*, *Pecam1*, *Thbs1*, and *Serpine1* expression.

HUVEC angiotube formation assay

Matrigel-based angiotube formation assay with HUVECs purchased from ATCC (CRL-1730; American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA) was used to assess the paracrine angiogenic potential of epicardial ASCs. In brief, ASCs were cultured up to 80% confluence; the culture medium was then removed and replaced with fresh medium. Forty-eight hours later, all the cell cultures were equally confluent, and the medium (secretome) was harvested, centrifuged at 1200 rpm for 10 min, and frozen at −80°C. Fresh DMEM supplemented with 10% FBS was frozen and used as the negative control. HUVECs were maintained in M199 medium (Thermo Fisher Scientific), supplemented with 20% FBS, 1% penicillin/streptomycin, 1% L-glutamine, 1% sodium pyruvate, 1% heparin, and 20 μg/ml endothelial cell growth factor. For the tube formation assay, HUVECs were trypsinized, and 2×10^4 cells were seeded into 96-well culture plates that were precoated with 50 μl of growth factor–reduced Matrigel. Thirty minutes after seeding, a 1:1 ratio of secretome medium and HUVEC medium was added. Three different combinations were used: DMEM supplemented with 10% FBS, secretome from control ASCs, and secretome from CVRF ASCs. The cells were incubated in a 37°C incubator with 5% CO_2 for 6 h, to allow the formation of tubes. Tubes from 3 fields per well (×40 magnification) were quantified with ImageJ 1.44p software (NIH). Each condition was assessed in triplicate.

Inhibition of Notch signaling pathway by *N*-[*N*-(3,5-difluorophenacetyl-L-alanyl)]-*S*-phenylglycine *t*-butyl ester treatment

ASCs were seeded at a density of 5×10^3 cells/cm^2 in 6-well plates. They were allowed to grow to 80% confluence and then were treated with 50 μM *N*-[*N*-(3,5-difluorophenacetyl-L-alanyl)]-*S*-phenylglycine *t*-butyl ester (DAPT), a γ-secretase inhibitor that blocks Notch pathway signaling (Calbiochem no 565784; Merck KGaA, Darmstadt, Germany) for 4 d before induction of endothelial differentiation. ASCs pretreated with vehicle (DMSO; Sigma-Aldrich) were used as the control group. To assess the response to DAPT treatment, after 4 d, RNA was extracted from treated ASCs, and the expression of Notch effector genes was measured.

Angiogenesis assay *in vivo*

For Matrigel plug injection, 6-wk-old nude mice were anesthetized with a combination of ketamine and medetomidine (75 and 0.5 mg/kg, i.p., respectively). ASCs (3×10^6), treated with 50 μM DAPT or vehicle (DMSO) for 4 d, were mixed with growth factor–reduced Matrigel to a final volume of 500 μl and were subcutaneously injected into the dorsum of the mice. As a negative control, Matrigel without cells was injected into the same animals. After 7 d, the mice were euthanized by cervical dislocation after anesthesia, and the Matrigel plugs were removed, visualized, and photographed with the Zoom 70XL OPTEM lens system (Qioptiq Photonics GmbH & Co. KG, Munich, Germany) coupled to a Retiga 1300i Fast camera (QImaging Corp., Burnaby, BC, Canada). The hemoglobin content of the ASC Matrigel plugs was analyzed by the Drabkin method. The plugs were homogenized in 250 μl PBS containing 0.1% Brij-35 (Sigma-Aldrich) with an electric homogenizer followed by centrifugation at 5000 *g* for 5 min. The supernatant was used in duplicate to measure hemoglobin by adding Drabkin's reagent (Sigma-Aldrich). The sample was incubated at room temperature for 5 min, and absorbance at 540 nm was measured with a spectrophotometer (SpectraMax 250; Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA).

Statistical analyses

Values are expressed as means ± SEM. Data were compared by 1-way ANOVA, followed by the Bonferroni *post hoc* test. Student's *t* test was used for single comparisons between control and CVRF groups. All statistical calculations were performed with GraphPad software (San Diego, CA, USA). Values were considered to be significantly different when $P < 0.05$.

RESULTS

EAT mass and cell content

Animals with CVRF clustering had a larger EAT mass than did the controls; however, when connective tissue fibers and adipocytes were removed, the number of cells in the SVF was similar in both groups. The amount of $CD90^+$ cells was significantly lower in the SVF of the CVRF animals (**Table 2**).

TABLE 2. *Analysis of cells obtained through the epicardial ASC isolation process*

EAT characterization	Control	CVRF	*P*
EAT weight (mg)	147 ± 32	376 ± 46	0.001
EAT weight/body weight (‰)	0.36 ± 0.10	0.93 ± 0.11	0.003
Total SVF cells obtained	1914 ± 489	1763 ± 290	0.77
Total CD90$^+$ cells in SVF	85.75 ± 21.91	28.56 ± 4.7	0.005

Data are means ± SEM. EAT depot was larger in CVRF-exposed rats. The dissected tissue was >2-fold greater in CVRF rats than in control animals. SVF was isolated from the obtained EAT; no significant difference in isolated cell number was found. In the SVF, the number of CD90$^+$ cells was significantly lower in CVRF animals (n = 10).

Characterization of SVF in CVRF and control rats

Expression of stemness genes was investigated in freshly isolated SVF cells. Genes governing multipotency, such as DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 3-β (*Dnmt3b*), fibroblast growth factor 2 (*Fgf2*), telomerase reverse transcriptase (tert), and podocalyxin-like protein 1 (*Podxl*) were down-regulated in SVF from CVRF-bearing rats compared with control rats (**Fig. 1*A***). Expression of Nanog homeobox (*Nanog*) and POU class 5 homeobox 1(*Pou5f1* or *Oct3/4*) genes was not detectable.

Characterization of isolated epicardial ASCs from CVRF and control rats

In the MTS assay, ASCs from CVRF animals showed a lower proliferation rate (P = 0.021) than ASCs from controls (Fig. 1*B*, *C*). ASCs at passage 3 were characterized by flow cytometry analysis of CD29, -44, and -90 (MSC markers) and CD45 (marker of hematopoietic cells). The number of CD45$^+$ cells was negligible, whereas the cells were positive for ASC markers in both groups (Fig. 1*D*).

Epicardial ASCs differentiation into mesenchymal cell lineages

To find out the effects of CVRF clustering in the differentiation capacity of ASCs, cells were induced for 21 d with specific adipogenic and osteogenic culture conditions. During the differentiation process, changes in ASC morphology were observed. Lipid staining and calcium deposition confirmed the differentiation to adipogenic and osteogenic lineages, respectively (Fig. 1*E*).

Differentiation of ASCs into adipocytes was evidenced by intracellular lipid droplets and the analysis of adipocyte markers. *Fabp4* was increased with respect to undifferentiated ASCs, both in control (P = 0.01) and in CVRFs (P = 0.01). *Lpl* and *CD36* showed the same pattern, appearing significantly increased in differentiated cells (control P = 0.008, CVRF P < 0.0001; and control P = 0.04, CVRF P = 0.04, respectively) (Fig. 1*F*).

After osteogenic induction, *Spp1* (also known as osteopontin), an extracellular structural protein expressed in bone-forming cells (osteoblasts and osteocytes), was strongly up-regulated in differentiated cells from both groups (control P < 0.001; CVRF P < 0.001). No differences were found in *Bglap* (also known as osteocalcin) mRNA levels, probably because of the high expression levels in undifferentiated cells. However, *Alpl* (alkaline phosphatase) appeared to be up-regulated in differentiated control ASCs (P = 0.007), but not in CVRF ASCs (P = 0.83). The levels of *Alpl* expression were significantly higher in the control than in the CVRF group (P = 0.03).

Paracrine proangiogenic effects of epicardial ASCs on HUVECs

To test proangiogenic paracrine effects of ASCs, a Matrigel-based HUVEC tube formation assay was performed. HUVECs were incubated with the secretomes (conditioned medium) of control ASCs and CVRF ASCs, and the total length of the formed tubular structures was measured. Control ASC secretomes promoted more extensive formation of HUVEC tubes (P < 0.05) than CVRF ASC secretomes (**Fig. 2*A*, *B***).

Epicardial ASC differentiation into endothelial cells

ASCs were induced to differentiate into endothelial cells. After 7 d, the ASCs' morphology changed drastically. The transcriptomic analysis revealed an increased *Kdr* expression in differentiated ASCs in both groups (P < 0.01). *Pecam1* expression significantly increased only in differentiated control ASCs, and *Vwf* did not show significant differences in expression. Two antiangiogenic genes were also analyzed, *Thbs1* was reduced in differentiated cells in both control (P < 0.0001) and CVRFs (P < 0.01), whereas *Serpine1* (Pai-1) gene expression was decreased but reached significance only in control ASCs (P < 0.05) (Fig. 2*C*). Functional assays, based on the formation of angiotubes in Matrigel, showed that the capability of CVRF ASCs to form tube-like structures was impaired (P = 0.03; Fig. 2*D*, *E*).

Epicardial ASCs from animals with CVRF clustering show an up-regulation of the Notch signaling pathway

The Notch signaling pathway is involved in a wide range of cell functions, including cell differentiation and proliferation and angiogenesis. Thus, a specific

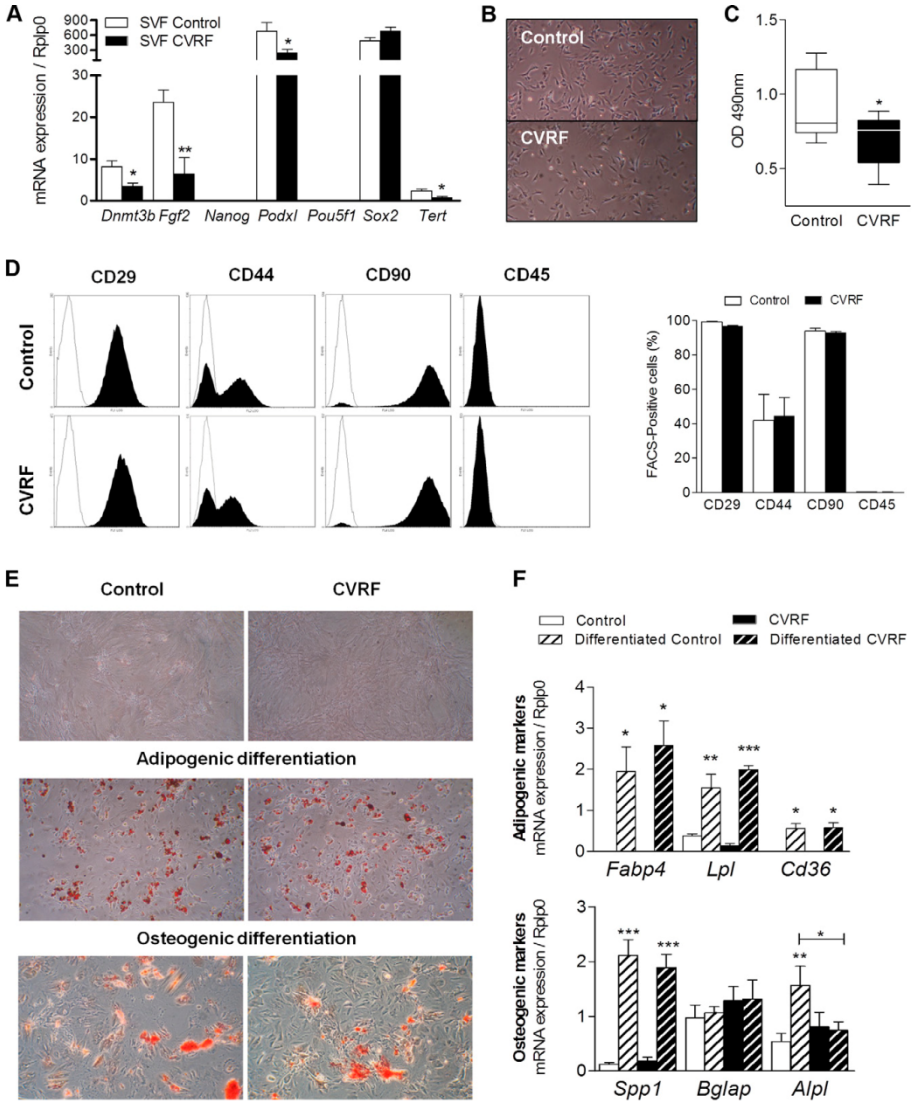


Figure 1. SVF and ASC characterization. *A*) Multipotency-related gene expression of SVF. *B*) Representative images of ASCs after 7 d in culture. *C*) Proliferation of ASCs assessed by MTS assay. *D*) Flow cytometry analysis for MSC markers of cultured epicardial ASCs. Representative histograms and percentage of CD29$^+$, -44$^+$, -90$^+$, and 45$^+$ cells at passage 3. *E, F*) Adipogenic and osteogenic differentiation of epicardial ASCs was evaluated by specific staining and RT-PCR. Adipogenic differentiation was evidenced by lipid droplets stained by the Herxheimer method. Alizarin red staining showed extracellular calcium ($n = 8$). $^*P < 0.05$; $^{**}P < 0.01$; $^{***}P < 0.001$.

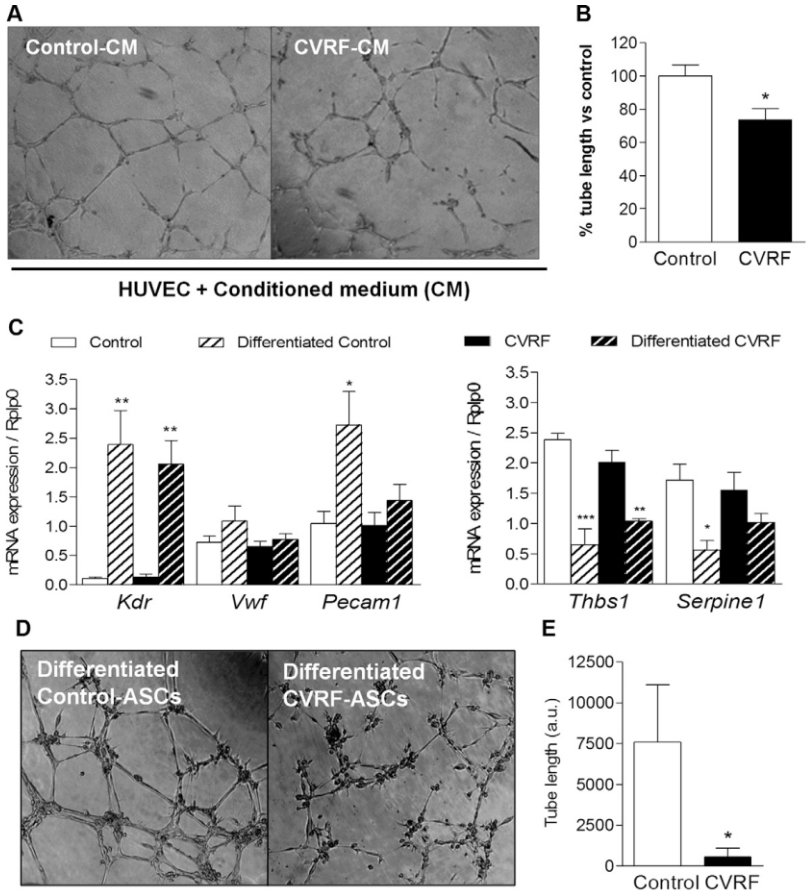


Figure 2. Angiogenic potential of epicardial ASCs. *A*, *B*) Paracrine proangiogenic effect of ASCs on HUVECs. Conditioned medium (CM) from epicardial ASCs was added to HUVECs, and a Matrigel-based tube formation assay was performed. Data are expressed as the percentage of tube length *vs.* control. *C*) mRNA expression of endothelial cell markers (*Kdr*, *Vwf*, and *Pecam1*) and antiangiogenic genes (*Thbs1*, *Serpine1*) in epicardial ASCs (undifferentiated and differentiated into endothelial phenotype). *D*) Representative images and total tube length of differentiated ASCs in Matrigel-based angiotube formation assay (n = 6). Magnification, ×40. $^{*}P < 0.05$; $^{**}P < 0.01$; $^{***}P < 0.001$.

Notch pathway PCR array was performed on ASCs to identify specific genes within this signaling pathway that could be affected by CVRF (Supplemental Table S2). After a 1.5-fold change threshold was applied, several genes involved in cell cycle regulation were found to be down-regulated in CVRF ASCs: Cyclin D1 (*Ccnd1*), Cyclin E1 (*Ccne1*), FBJ osteosarcoma oncogene (*Fos*), FOS-like antigen 1 (*Fosl1*), and Hairless (*Hr*) (**Fig. 3*A***). Expression of *Pparg*, a regulator of adipocyte differentiation, was increased (P = 0.001) in the CVRF rats. c-Fos induced growth factor (*Figf*), a member of the platelet-derived growth factor/vascular endothelial growth factor (PDGF/VEGF) family, which is active in angiogenesis, appeared significantly decreased (P = 0.008) in the CVRF group. In relation to Notch ligands (Fig. 3*B*), whereas Delta-like 1 (*Dll1*), Delta-like 4 (*Dll4*), and jagged 2 (*Jag2*) had a modest expression; jagged 1 (*Jag1*) was strongly transcribed. Only Delta-like 3 (*Dll3*) showed significant differences between groups (P = 0.006). Although no differences in Notch receptor expression were found between control ASCs and CVRF ASCs, *Notch2* was the most highly expressed receptor in ASCs (Fig. 3*C*). Three downstream effectors were up-regulated in CVRF ASCs (*Hey1*, P = 0.03; *Heyl*, P = 0.03; and *Hes7*,

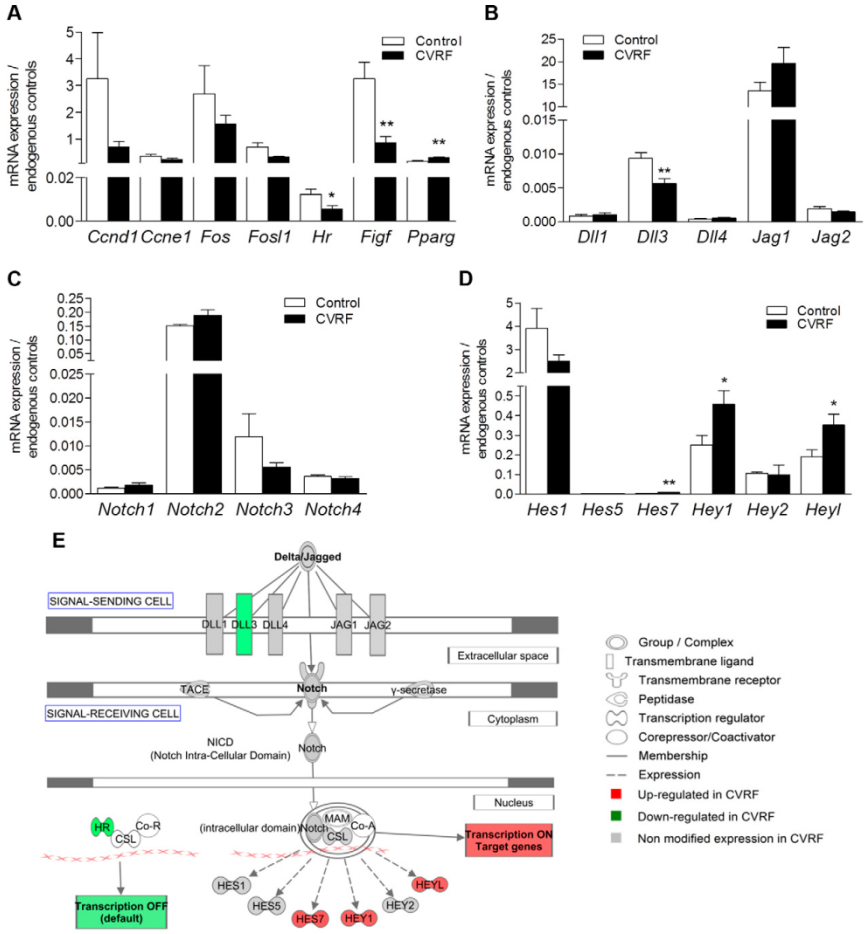


Figure 3. Notch pathway-specific array. A regulation threshold of 1.5-fold was applied to select differential expressed genes. *A*) Cell cycle regulator and differentiation-related genes involved in the Notch signaling pathway, (*B*) Notch ligands, (*C*) Notch receptors, (*D*) Notch target effectors, and (*E*) a Notch pathway diagram showing affected genes ($n = 6$). $*P < 0.05$; $**P < 0.01$.

$P = 0.001$) (Fig. 3*D*). Figure 3*E* is a diagram of the Notch canonical signaling pathway showing up- and down-regulated genes in CVRF ASCs (Ingenuity Pathways Analysis software; Qiagen Silicon Valley, Redwood, CA, USA).

Notch inhibition by DAPT increases angiotube formation *in vitro* and angiogenic potential of epicardial ASCs from CVRF animals

To clarify whether the activation of Notch pathway is the cause of the reduced angiogenic potential observed in CVRF ASCs, endothelial differentiation was induced by pretreating ASCs with an inhibitor of the Notch signaling pathway. Although DAPT, a γ-secretase inhibitor, did not induced great changes in control ASC gene expression or tube formation capacity, DAPT treatment induced a sharp decrease in Notch downstream gene expression in CVRF ASCs, which proved specificity for Notch pathway inhibition. The *in vitro* angiotube formation assay showed that the ability to form tubule-like structures increased in DAPT-treated CVRF ASCs when seeded in Matrigel. Transcription of *Vwf*, *Pecam1*, *Thbs1*, and *Serpine1* was regulated according to the rescued angiotube formation (**Fig. 4**).

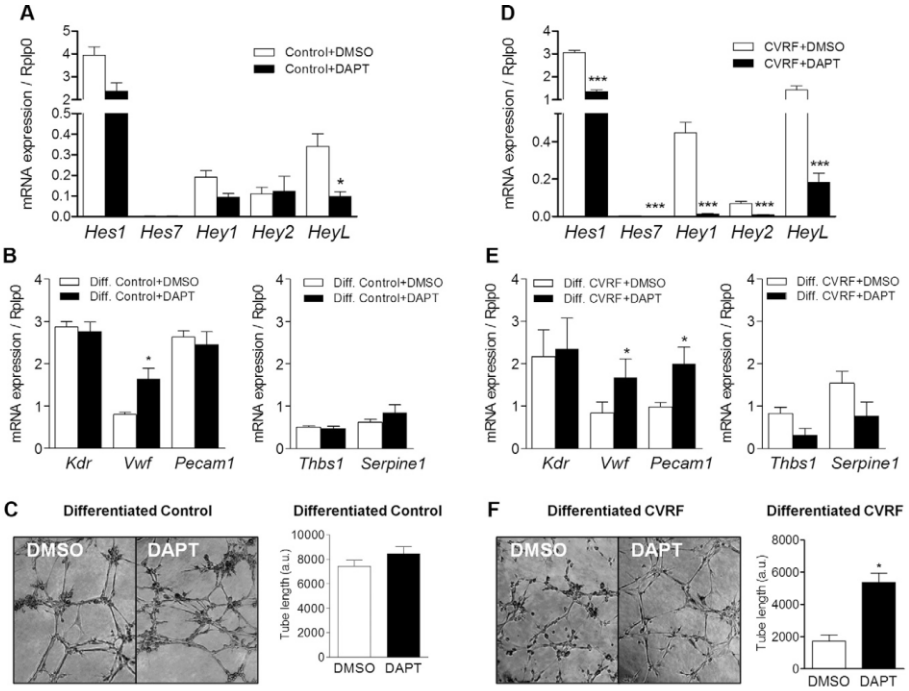


Figure 4. DAPT-treatment reduces significantly the expression of Notch targets and increases the ability to form tubular structures after endothelial differentiation of CVRF ASCs. Control and CVRF ASCs were treated with DAPT (50 μM) or vehicle (DMSO) for 4 d before endothelial differentiation. Analysis of mRNA expression of Notch target effectors, specific endothelial markers, and antiangiogenic genes after endothelial differentiation. Representative images and total tube length of differentiated ASCs in Matrigel-based angiotube formation assay of the control (*A–C*) and CVRF (*D–F*) groups ($n = 4$). Magnification, ×40. $^*P < 0.05$; $^{***}P < 0.001$.

The angiogenic capacity of undifferentiated epicardial ASCs was then investigated *in vivo* in a Matrigel angiogenesis plug assay in immunodeficient mice. Plug observation and hemoglobin content indicated a significant increase in angiogenesis in CVRF ASCs plugs after DAPT treatment (**Fig. 5**). Angiogenesis *in vivo* was not altered by the treatment of control ASCs with DAPT.

DISCUSSION

Clustering of hypercholesterolemia, hyperglycemia, and obesity confers a high cardiovascular risk. The function of circulating endothelial progenitor cells and the therapeutic potency of bone marrow MSCs appear to be impaired in metabolic syndrome (16, 17). In our study, we showed for the first time that resident epicardial ASCs in animals with CVRFs lose their original angiogenic potential. Furthermore, we identified Notch pathway activation as the origin of the reduced proangiogenic potential of epicardial ASCs exposed to CVRFs.

In agreement with human data (6), CVRF rats had a larger mass of EAT than did the lean control rats. Despite the greater volume of tissue, an analysis of the SVF revealed that the number of cells in CVRF rats was similar to that in the control animals in this fraction. However, the cytometry analysis revealed that there were a significantly lower number of $CD90^+$ cells in the SVF of CVRF rats, suggesting a reduced number of MSCs. Subsequently, the transcriptomic analysis performed to evaluate the stemness potential revealed an overall down-regulation of stemness-related gene transcription in the SVF of CVRF-exposed animals. Genes governing maintenance of the proliferative activity (*Dnmt3b*), the undifferentiated state (*Fgf2*), and the telomerase activity (*Tert*) of CVRF ASCs showed an ~50% reduced expression compared with that in the controls. A recent study of the EAT transcriptome in humans has described a trend toward suppression of diverse gene sets involved in fundamental cellular functions in the EAT of CAD patients compared with individuals without CAD (18). In line with these findings, we provide evidence supporting that the presence of CVRF in ZDF rats

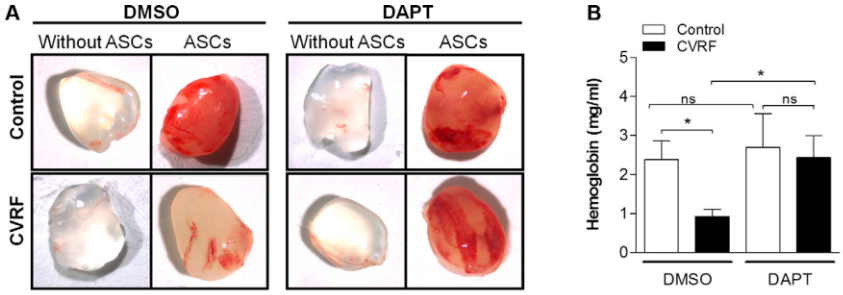


Figure 5. Notch inhibition increases the angiogenic potential *in vivo* of CVRF ASCs. Matrigel plugs containing undifferentiated ASCs treated with DAPT or vehicle (DMSO) were injected subcutaneously in nude mice. Matrigel plugs without cells were used as negative controls. A macroscopic view of the plugs 7 d after injection (*A*) shows an increased formation of blood vessels in DAPT-treated CVRF ASCs compared to untreated CVRF ASCs. *B*) Quantification of ASC plug hemoglobin content by Drabkin's method ($n = 4$). $^*P < 0.05$.

down-regulates the transcription of stemness-related genes within the SVF. These findings may be explained by both a reduced amount of epicardial ASCs and a reduced multipotency of the ASCs found in the SVF.

By definition, a stem cell is characterized by its capacity for self-renewal and by its ability to differentiate into multiple cell lineages (19). ASCs from both groups showed the ability to differentiate into the adipogenic and osteogenic lineages, although the lower expression of *Alpl* suggests a reduced osteogenic differentiation potential in CVRF ASCs. A significantly different behavior was found in ASCs derived from CVRF animals when induced to differentiate into endothelial cells. Even though *Kdr* was drastically increased in both groups, ASCs from CVRF rats did not form tubular structures of the same length as those formed by ASCs from control animals, and *Pecam1* expression was not increased, suggesting reduced angiogenesis. Some alterations found in CVRF ASCs could explain their decreased capability to form new vessels. Plasminogen activator inhibitor-1 (*Pai-1* or *Serpine1*), an inhibitor of angiogenesis (20), did not show down-regulation after endothelial differentiation. Pai-1 inhibits matrix metalloproteinases interfering with formation of angiotubes. In addition, that the increased expression of *Pparg* has been described as a potent inhibitor of angiogenesis is noteworthy (21). Induced *Pparg* transcription was found to be associated with an enhancement of Notch activation (22). Finally, *Figf*, a member of the PDGF/VEGF family, active in angiogenesis and endothelial cell growth, (23, 24) was strongly down-regulated in CVRF ASCs.

Paracrine functions of stem cells have been related to their regenerative potential, which in proangiogenic terms could be even more important than their differentiation potential (25–28). Our results showed that CVRF-exposed ASCs have an impaired proangiogenic paracrine effect on endothelial cells that would be detrimental in new vessel formation after ischemic injury.

To identify the mechanism behind the reduced proangiogenic potential in ASCs of the EAT of CVRF animals, we analyzed the transcriptomic profile of these cells. The Notch signaling pathway was investigated because of its implied role in cell fate determination (29–32). We found all Notch receptors (Notch1–4), ligands (*Dll1*, *Dll3*, *Dll4*, *Jag1*, and *Jag2*), and Notch direct target genes (Hes/Hey family) expressed in all epicardial ASCs. *Notch2* was the most expressed receptor of this family. The transcripts of downstream genes *Hey1* and *Heyl* appeared to be up-regulated in the CVRF ASCs. CVRFs did not affect Notch receptor expression levels, but reduced *Dll3* and *Hr*, which are Notch antagonists when overexpressed in mammals (33) and *Drosophila melanogaster* (34, 35), respectively. Thus, an overactivation of Notch signaling is present in epicardial ASCs from animals with CVRFs. It has been found that advanced glycation end products up-regulate the Notch-Hes1 pathway in neural stem cells *in vitro* (36). Another plausible explanation of the Notch overactivated state in ASCs could be the increased visceral adipose tissue volume in CVRF rats, which induces systemic inflammation attracting macrophages to adipose tissue and leading to enhanced secretion of inflammatory adipokines and cytokines (37). Another study has reported an increased expression of Notch pathway members in the presence of inflammatory cytokines (38). This chronic inflammatory state is related as well to hypercholesterolemia and to insulin resistance. Some investigators have found a link between overactivation of Notch and insulin resistance in hepatocytes (39, 40).

To elucidate whether Notch pathway activation is causal in the impaired proangiogenic capacity of CVRF ASCs, we investigated the effects of Notch pathway inhibition. DAPT, a γ-secretase inhibitor, induced a decrease in Notch target genes, which confirmed the inhibition of the pathway. High levels of Notch signaling have been shown to correlate with adult (non-stem) cell quiescence or slow cell cycle progression (41, 42), which is a pattern similar to that reported here in stem cells. Notch up-regulation in ASCs reduces expression of cell-cycle–related genes and the proliferation rates.

On the other hand, it has been described that Notch signaling activation in stem cells leads to the maintenance

of self-renewal potential through the activation of Hes/Hey genes, which encode transcriptional repressors that shut down gene expression for tissue-specific transcription factors, thereby inhibiting terminal differentiation in proliferating cells (43, 44). This mechanism could explain the lack of vasculogenic differentiation in CVRF ASCs. Notch receptors and ligands are influenced by a broad spectrum of posttranslational modifications and other cellular processes that strongly modulate Notch pathway activity in specific contexts (45, 46), so Notch may have different roles depending on the cell type, localization, or differentiation process. Earlier work by our group described the implication of the Notch system in the intrinsic differences between ASCs from visceral and subcutaneous fat depots, regarding their adipogenic capabilities (47). Notch receptors and downstream effectors were 5- to 50-fold downregulated in subcutaneous ASCs in comparison to visceral ASCs, which led to a significantly increased adipogenic differentiation potential of the subcutaneous ASCs. In epicardial ASCs, the presence of CVRF induces differences in Notch expression that do not lead to major effects on their adipocyte and osteocyte differentiation, given that epicardial ASCs from both groups achieved the differentiated phenotype. However, in epicardial ASCs, Notch activation is a key element in angiogenic potential. Specific Notch signaling inhibition by DAPT induced downregulation of Hes/Hey genes and rescued the angiogenic potential in CVRF ASCs to the levels of control ASCs (never exposed to CVRFs). This finding highlights the regulatory importance of Notch signaling in epicardial ASCs and provides a possible new target for improving the endogenous angiogenesis in the ischemic heart. In this study, we showed that epicardial ASCs can be rescued to an angiogenic phenotype and that local conditioning of ASCs may be a future treatment target. However, we must take into account that Notch signaling is a conserved and broadly expressed pathway that exerts different roles, depending on specific contexts. Although activation of Notch in stem cells leads to a quiescent state, in endothelial cells, Notch coordinates fate specification at the end of sprouts (48). Thus, additional studies in animal models of ischemia are necessary to approach a clinical translation of these findings.

In conclusion, for the first time, we report that exposure to CVRFs impairs the angiogenic capacity of epicardial ASCs because of an overactivation of the Notch pathway and that inhibition of Notch rescues stem cell angiogenic function. FJ

The authors thank Dr. Javier Crespo and Dr. Sandra Camino from the Cardiovascular Research Center (CSIC-ICCC) for technical help with flow cytometry and support in gene expression analyses, respectively. This work was supported Spanish Ministry of Health–Instituto de Salud Carlos III (Grants RIC RD/13/000 and RETIC TERCEL RD/13/0010), and the Spanish Ministry of Science and Innovation (Grant PNS SAF2010/16549). M.T.B. holds a predoctoral fellowship from the Catalan Government (FI-DGR2013), and R.F.L. is the recipient of a Sara Borrell contract from the Spanish Ministry of Science and Innovation–Instituto de Salud Carlos III. L.B. is the Cardiovascular Research Chair, Universitat Autònoma de Barcelona (Barcelona, Spain). The authors declare no conflicts of interest.

REFERENCES

1. Forbes, J. M., and Cooper, M. E. (2013) Mechanisms of diabetic complications. *Physiol. Rev.* **93**, 137–188
2. Bernal-Lopez, M. R., Llorente-Cortes, V., Calleja, F., Lopez-Carmona, D., Mayas, M. D., Gomez-Huelgas, R., Badimon, L., and Tinahones, F. J. (2013) Effect of different degrees of impaired glucose metabolism on the expression of inflammatory markers in monocytes of patients with atherosclerosis. *Acta Diabetol.* **50**, 553–562
3. Rydén, L., Grant, P. J., Anker, S. D., Berne, C., Cosentino, F., Danchin, N., Deaton, C., Escaned, J., Hammes, H. P., Huikuri, H., Marre, M., Marx, N., Mellbin, L., Ostergren, J., Patrono, C., Seferovic, P., Uva, M. S., Taskinen, M. R., Tendera, M., Tuomilehto, J. P., Zamorano, J. L., Achenbach, S., Baumgartner, H., Bax, J. J., Bueno, H., Dean, V., Deaton, C., Erol, C., Fagard, R., Ferrari, R., Hasdai, D., Hoes, A. W., Kirchhof, P., Knuuti, J., Kolh, P., Lancellotti, P., Linhart, A., Nihoyannopoulos, P., Piepoli, M. F., Ponikowski, P., Sirnes, P. A., Tamargo, J. L., Torbicki, A., Wijns, W., Windecker, S., De Backer, G., Ezquerra, E. A., Avogaro, A., Badimon, L., Baranova, E., Baumgartner, H., Betteridge, J., Ceriello, A., Fagard, R., Funck-Brentano, C., Gulba, D. C., Hasdai, D., Hoes, A. W., Kjekshus, J. K., Knuuti, J., Kolh, P., Lev, E., Mueller, C., Neyses, L., Nilsson, P. M., Perk, J., Ponikowski, P., Reiner, Z., Sattar, N., Schächinger, V., Scheen, A., Schirmer, H., Strömberg, A., Sudzhaeva, S., Viigimaa, M., Vlachopoulos, C., and Xuereb, R. G. (2013) ESC guidelines on diabetes, pre-diabetes, and cardiovascular diseases developed in collaboration with the EASD: the Task Force on Diabetes, Pre-diabetes, and Cardiovascular Diseases of the European Society of Cardiology (ESC) and developed in collaboration with the European Association for the Study of Diabetes (EASD). *Eur. Heart J.* **34**, 3035–3087
4. Iacobellis, G., Corradi, D., and Sharma, A. M. (2005) Epicardial adipose tissue: anatomic, biomolecular and clinical relationships with the heart. *Nat. Clin. Pract. Cardiovasc. Med.* **2**, 536–543
5. Iacobellis, G., Lonn, E., Lamy, A., Singh, N., and Sharma, A. M. (2011) Epicardial fat thickness and coronary artery disease correlate independently of obesity. *Int. J. Cardiol.* **146**, 452–454
6. Wang, C. P., Hsu, H. L., Hung, W. C., Yu, T. H., Chen, Y. H., Chiu, C. A., Lu, L. F., Chung, F. M., Shin, S. J., and Lee, Y. J. (2009) Increased epicardial adipose tissue (EAT) volume in type 2 diabetes mellitus and association with metabolic syndrome and severity of coronary atherosclerosis. Clin. Endocrinol. (Oxf.) **70**, 876–882
7. Mazurek, T., Zhang, L., Zalewski, A., Mannion, J. D., Diehl, J. T., Arafat, H., Sarov-Blat, L., O'Brien, S., Keiper, E. A., Johnson, A. G., Martin, J., Goldstein, B. J., and Shi, Y. (2003) Human epicardial adipose tissue is a source of inflammatory mediators. *Circulation* **108**, 2460–2466
8. Baker, A. R., Silva, N. F., Quinn, D. W., Harte, A. L., Pagano, D., Bonser, R. S., Kumar, S., and McTernan, P. G. (2006) Human epicardial adipose tissue expresses a pathogenic profile of adipocytokines in patients with cardiovascular disease. *Cardiovasc. Diabetol.* **5**, 1
9. Karastergiou, K., Evans, I., Ogston, N., Miheisi, N., Nair, D., Kaski, J. C., Jahangiri, M., and Mohamed-Ali, V. (2010) Epicardial adipokines in obesity and coronary artery disease induce atherogenic changes in monocytes and endothelial cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **30**, 1340–1346
10. Rubina, K., Kalinina, N., Efimenko, A., Lopatina, T., Melikhova, V., Tsokolaeva, Z., Sysoeva, V., Tkachuk, V., and Parfyonova, Y. (2009) Adipose stromal cells stimulate angiogenesis via promoting progenitor cell differentiation, secretion of angiogenic factors, and enhancing vessel maturation. *Tissue Eng. Part A* **15**, 2039–2050
11. Carmeliet, P. (2005) Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature* **438**, 932–936
12. Ferrer-Lorente, R., Bejar, M. T., Tous, M., Vilahur, G., and Badimon, L. (2014) Systems biology approach to identify alterations in the stem cell reservoir of subcutaneous adipose tissue in a rat model of diabetes: effects on differentiation potential and function. *Diabetologia*
13. Oñate, B., Vilahur, G., Camino-López, S., Díez-Caballero, A., Ballesta-López, C., Ybarra, J., Moscatiello, F., Herrero, J., and Badimon, L. (2013) Stem cells isolated from adipose tissue of obese patients show changes in their transcriptomic profile that indicate loss in stemcellness and increased commitment to an adipocyte-like phenotype. *BMC Genomics* **14**, 625
14. Oñate, B., Vilahur, G., Ferrer-Lorente, R., Ybarra, J., Díez-Caballero, A., Ballesta-López, C., Moscatiello, F., Herrero, J., and Badimon, L. (2012) The subcutaneous adipose tissue reservoir of functionally active stem cells is reduced in obese patients. *FASEB J.* **26**, 4327–4336

15. Gomes, S. A., Rangel, E. B., Premer, C., Dulce, R. A., Cao, Y., Florea, V., Balkan, W., Rodrigues, C. O., Schally, A. V., and Hare, J. M. (2013) S-nitrosoglutathione reductase (GSNOR) enhances vasculogenesis by mesenchymal stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **110**, 2834–2839
16. Li, T. S., Furutani, A., Takahashi, M., Ohshima, M., Qin, S. L., Kobayashi, T., Ito, H., and Hamano, K. (2006) Impaired potency of bone marrow mononuclear cells for inducing therapeutic angiogenesis in obese diabetic rats. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **290**, H1362–H1369
17. Tepper, O. M., Galiano, R. D., Capla, J. M., Kalka, C., Gagne, P. J., Jacobowitz, G. R., Levine, J. P., and Gurtner, G. C. (2002) Human endothelial progenitor cells from type II diabetics exhibit impaired proliferation, adhesion, and incorporation into vascular structures. *Circulation* **106**, 2781–2786
18. McAninch, E. A., Fonseca, T. L., Poggioli, R., Panos, A. L., Salerno, T. A., Deng, Y., Li, Y., Bianco, A. C., and Iacobellis, G. (2015) Epicardial adipose tissue has a unique transcriptome modified in severe coronary artery disease. Obesity (Silver Spring) **23**, 1267–1278
19. Gimble, J. M., Katz, A. J., and Bunnell, B. A. (2007) Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circ. Res.* **100**, 1249–1260
20. Stefansson, S., Petitclerc, E., Wong, M. K., McMahon, G. A., Brooks, P. C., and Lawrence, D. A. (2001) Inhibition of angiogenesis in vivo by plasminogen activator inhibitor-1. *J. Biol. Chem.* **276**, 8135–8141
21. Xin, X., Yang, S., Kowalski, J., and Gerritsen, M. E. (1999) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands are potent inhibitors of angiogenesis in vitro and in vivo. *J. Biol. Chem.* **274**, 9116–9121
22. Distel, E., Penot, G., Cadoudal, T., Balguy, I., Durant, S., and Benelli, C. (2012) Early induction of a brown-like phenotype by rosiglitazone in the epicardial adipose tissue of fatty Zucker rats. *Biochimie* **94**, 1660–1667
23. Leppänen, V. M., Jeltsch, M., Anisimov, A., Tvorogov, D., Aho, K., Kalkkinen, N., Toivanen, P., Ylä-Herttuala, S., Ballmer-Hofer, K., and Alitalo, K. (2011) Structural determinants of vascular endothelial growth factor-D receptor binding and specificity. *Blood* **117**, 1507–1515
24. Marconcini, L., Marchio, S., Morbidelli, L., Cartocci, E., Albini, A., Ziche, M., Bussolino, F., and Oliviero, S. (1999) c-fos-induced growth factor/vascular endothelial growth factor D induces angiogenesis in vivo and in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 9671–9676
25. Burchfield, J. S., and Dimmeler, S. (2008) Role of paracrine factors in stem and progenitor cell mediated cardiac repair and tissue fibrosis. *Fibrogenesis Tissue Repair* **1**, 4
26. Hsiao, S. T., Lokmic, Z., Peshavariya, H., Abberton, K. M., Dusting, G. J., Lim, S. Y., and Dilley, R. J. (2013) Hypoxic conditioning enhances the angiogenic paracrine activity of human adipose-derived stem cells. *Stem Cells Dev.* **22**, 1614–1623
27. Kilroy, G. E., Foster, S. J., Wu, X., Ruiz, J., Sherwood, S., Heifetz, A., Ludlow, J. W., Stricker, D. M., Potiny, S., Green, P., Halvorsen, Y. D., Cheatham, B., Storms, R. W., and Gimble, J. M. (2007) Cytokine profile of human adipose-derived stem cells: expression of angiogenic, hematopoietic, and pro-inflammatory factors. *J. Cell. Physiol.* **212**, 702–709
28. Matsuda, K., Falkenberg, K. J., Woods, A. A., Choi, Y. S., Morrison, W. A., and Dilley, R. J. (2013) Adipose-derived stem cells promote angiogenesis and tissue formation for in vivo tissue engineering. *Tissue Eng. Part A* **19**, 1327–1335
29. Artavanis-Tsakonas, S., Rand, M. D., and Lake, R. J. (1999) Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science* **284**, 770–776
30. Osathanon, T., Subbalekha, K., Sastravaha, P., and Pavasant, P. (2012) Notch signalling inhibits the adipogenic differentiation of single-cell-derived mesenchymal stem cell clones isolated from human adipose tissue. *Cell Biol. Int.* **36**, 1161–1170
31. Huang, Y., Yang, X., Wu, Y., Jing, W., Cai, X., Tang, W., Liu, L., Liu, Y., Grottkau, B. E., and Lin, Y. (2010) gamma-secretase inhibitor induces adipogenesis of adipose-derived stem cells by regulation of Notch and PPAR-gamma. *Cell Prolif.* **43**, 147–156
32. Jing, W., Xiong, Z., Cai, X., Huang, Y., Li, X., Yang, X., Liu, L., Tang, W., Lin, Y., and Tian, W. (2010) Effects of gamma-secretase inhibition on the proliferation and vitamin D(3) induced osteogenesis in adipose derived stem cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **392**, 442–447
33. Ladi, E., Nichols, J. T., Ge, W., Miyamoto, A., Yao, C., Yang, L. T., Boulter, J., Sun, Y. E., Kintner, C., and Weinmaster, G. (2005) The divergent DSL ligand Dll3 does not activate Notch signaling but cell autonomously attenuates signaling induced by other DSL ligands. *J. Cell Biol.* **170**, 983–992
34. Barolo, S., Stone, T., Bang, A. G., and Posakony, J. W. (2002) Default repression and Notch signaling: Hairless acts as an adaptor to recruit the corepressors Groucho and dCtBP to Suppressor of Hairless. *Genes Dev.* **16**, 1964–1976
35. Maier, D. (2006) Hairless: the ignored antagonist of the Notch signalling pathway. *Hereditas* **143**, 212–221
36. Guo, Y., Wang, P., Sun, H., Cai, R., Xia, W., and Wang, S. (2013) Advanced glycation end product-induced astrocytic differentiation of cultured neurospheres through inhibition of Notch-Hes1 pathway-mediated neurogenesis. *Int. J. Mol. Sci.* **15**, 159–170
37. Faber, D. R., van der Graaf, Y., Westerink, J., and Visseren, F. L. (2010) Increased visceral adipose tissue mass is associated with increased C-reactive protein in patients with manifest vascular diseases. *Atherosclerosis* **212**, 274–280
38. Wang, H., Tian, Y., Wang, J., Phillips, K. L., Binch, A. L., Dunn, S., Cross, A., Chiverton, N., Zheng, Z., Shapiro, I. M., Le Maitre, C. L., and Risbud, M. V. (2013) Inflammatory cytokines induce NOTCH signaling in nucleus pulposus cells: implications in intervertebral disc degeneration. *J. Biol. Chem.* **288**, 16761–16774
39. Pajvani, U. B., Shawber, C. J., Samuel, V. T., Birkenfeld, A. L., Shulman, G. I., Kitajewski, J., and Accili, D. (2011) Inhibition of Notch signaling ameliorates insulin resistance in a FoxO1-dependent manner. *Nat. Med.* **17**, 961–967
40. Li, H., Lee, J., He, C., Zou, M. H., and Xie, Z. (2014) Suppression of the mTORC1/STAT3/Notch1 pathway by activated AMPK prevents hepatic insulin resistance induced by excess amino acids. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **306**, E197–E209
41. Ninov, N., Borius, M., and Stainier, D. Y. (2012) Different levels of Notch signaling regulate quiescence, renewal and differentiation in pancreatic endocrine progenitors. *Development* **139**, 1557–1567
42. Chapouton, P., Skupien, P., Hesl, B., Coolen, M., Moore, J. C., Madelaine, R., Kremmer, E., Faus-Kessler, T., Blader, P., Lawson, N. D., and Bally-Cuif, L. (2010) Notch activity levels control the balance between quiescence and recruitment of adult neural stem cells. *J. Neurosci.* **30**, 7961–7974
43. Bigas, A., and Espinosa, L. (2012) Hematopoietic stem cells: to be or Notch to be. *Blood* **119**, 3226–3235
44. Liu, J., Sato, C., Cerletti, M., and Wagers, A. (2010) Notch signaling in the regulation of stem cell self-renewal and differentiation. *Curr. Top. Dev. Biol.* **92**, 367–409
45. Koch, U., Lehal, R., and Radtke, F. (2013) Stem cells living with a Notch. *Development* **140**, 689–704
46. Borggrefe, T., Lauth, M., Zwijsen, A., Huylebroeck, D., Oswald, F., and Giaimo, B. D. (2016) The Notch intracellular domain integrates signals from Wnt, Hedgehog, TGFβ/BMP and hypoxia pathways. *Biochim. Biophys. Acta* **1863**, 303–313
47. Ferrer-Lorente, R., Bejar, M. T., and Badimon, L. (2014) Notch signaling pathway activation in normal and hyperglycemic rats differs in the stem cells of visceral and subcutaneous adipose tissue. *Stem Cells Dev.* **23**, 3034–3048
48. Hellström, M., Phng, L. K., Hofmann, J. J., Wallgard, E., Coultas, L., Lindblom, P., Alva, J., Nilsson, A. K., Karlsson, L., Gaiano, N., Yoon, K., Rossant, J., Iruela-Arispe, M. L., Kalén, M., Gerhardt, H., and Betsholtz, C. (2007) Dll4 signalling through Notch1 regulates formation of tip cells during angiogenesis. *Nature* **445**, 776–780

Received for publication January 29, 2016.
Accepted for publication April 18, 2016.

SUPPLEMENTAL MATERIAL

	Control	CVRF	p-value
Weight	277.3 ± 18.64	316.9 ± 19.47	0.01
Fasting glucose (mmol/l)	5.38 ± 0.20	22.07 ± 1.65	< 0.0001
Total cholesterol (mmol/)	2.54 ± 0.14	5.85 ± 0.37	< 0.0001
LDL cholesterol (mmol/l)	1.90 ± 0.34	3.04 ± 0.25	0.03
Non-HDL cholesterol (mmol/l)	1.44 ± 0.32	3.83 ± 0.50	0.0007
Triacylglycerols (mmol/l)	1.26 ± 0.11	7.76 ± 1.01	< 0.0001
Urea (mmol/l)	14.63 ± 1.23	17.67 ± 1.44	ns
Protein (g/l)	80.50 ± 3.69	90.60 ± 5.96	ns
GOT(U/l)	92.94 ± 9.28	67.02 ± 12.59	ns
GPT (U/l)	42.63 ± 2.11	60.12 ± 9.72	ns
Creatinine (µmol/l)	48.50 ± 4.64	42.10 ± 3.61	ns

Table S1. Metabolic profile. Data are shown as mean ± SEM (n=10). ns: not statistically significant, CVRF: cardiovascular risk factors

Gene	Fold-Regulation CVRF vs. control	p-value
Adam10	-1,01	0,975
Adam17	-1,1	0,614
Aes	1,01	0,869
Axin1	1,02	0,888
Cbl	1,16	0,342
Ccnd1	-4,54	0,219
Ccne1	-1,55	0,121
Cd44	-1,49	0,387
Cdc16	-1,07	0,399
Cdkn1a	-1,1	0,81
Cflar	-1,13	0,458
Chuk	1,06	0,679
Ctnnb1	1,08	0,572
Dll1	1,22	0,629
Dll3	-1,65	0,007
Dll4	1,48	0,289
Ep300	1,15	0,313
Erbb2	-1,02	0,874
Figf	-3,71	0,009
Fos	-1,72	0,375
Fosl1	-2,08	0,059
Fzd1	1,08	0,835
Fzd2	1,4	0,222
Fzd3	1,06	0,856
Fzd4	1,33	0,157
Fzd5	-1,02	0,937
Fzd6	-1,34	0,637
Fzd7	-1,18	0,517
Gbp2	1,06	0,58
Gsk3b	1,08	0,37
Hdac1	-1,24	0,044
Hes1	-1,56	0,188
Hes5	1,01	0,959
Hes7	1,60	0,002
Hey1	1,84	0,043
Hey2	-1,08	0,851
Heyl	1,84	0,041
Hoxb4	1,09	0,648
Hr	-2,19	0,05
Il17b	2,59	0,044

Gene	Fold-Regulation CVRF vs. control	p-value
Il6st	-1,22	0,376
Jag1	1,45	0,173
Jag2	-1,32	0,533
Lfng	-1,06	0,763
Lmo2	1,39	0,319
Lrp5	-1,12	0,761
Map1b	1,12	0,538
Map2k7	-1,01	0,934
Mmp7	1,37	0,753
Mycl1	1,32	0,553
Ncor2	-1,14	0,421
Ncstn	1,02	0,913
Neurl	-1,14	0,554
Nfkb1	-1,01	0,936
Nfkb2	-1,03	0,927
Notch1	1,53	0,249
Notch2	1,25	0,09
Notch3	-2,13	0,271
Notch4	-1,13	0,404
Nr4a2	-1,03	0,899
Numb	1,2	0,261
Pcaf	-1,08	0,455
Pdpk1	1,1	0,64
Pofut1	1,04	0,912
Pparg	1,86	0,001
Psen1	1,01	0,938
Psen2	-1,08	0,822
Psenen	-1,09	0,602
Rbpjl	1,19	0,452
Rfng	-1,06	0,612
Runx1	1,3	0,304
Sel1l	1,11	0,584
Smo	1,19	0,361
Stat6	-1,08	0,477
Sufu	-1,02	0,83
Supt6h	-1,02	0,818
Tead1	1,15	0,394
Tle1	1,26	0,094
Wisp1	1,31	0,339
Wnt11	-1,17	0,798

Table S2. Notch pathway specific array of epicardial ASCs. Results are expressed as fold-up or down regulation of CVRF *vs.* control. CVRF: cardiovascular risk factors.

ARTÍCULO 4

"Bone marrow cell transplant from donors with cardiovascular risk factors increases the pro-atherosclerotic phenotype in the recipients"

Maria Teresa Bejar[1]*, Rodrigo Hernández-Vera[1]*, Gemma Vilahur[1], Lina Badimon[1,2]

[1]Cardiovascular Research Center, CSIC-ICCC , Hospital de la Santa Creu i Sant Pau (UAB), Barcelona, Spain.

[2]Cardiovascular Research Chair, UAB, Barcelona, Spain.

*Estos autores han contribuido por igual en este trabajo.

Publicado en: American Journal of Transplantation. 2016 Jul 16. doi: 10.1111/ajt.13962

Factor de impacto (2015): 5.669

RESUMEN

El trasplante de médula ósea de donantes con factores de riesgo cardiovascular incrementa el fenotipo pro-aterosclerótico en los receptores

La supervivencia a largo plazo de pacientes sometidos a un trasplante de médula ósea ha permitido observar en ellos un aumento de la aparición de factores de riesgo cardiovascular, un mayor riesgo de desarrollar síndrome metabólico y una mayor propensión a sufrir eventos cardiovasculares de forma prematura. Sin embargo, los estudios realizados hasta el momento no han descrito de forma satisfactoria el mecanismo por el cual los factores relacionados con el trasplante están asociados con estas observaciones. En estos estudios, no se ha prestado atención a cómo los factores de riesgo que pudieran estar afectando la médula de los donantes pueden tener un efecto en el riesgo cardiovascular de los receptores. Por tanto, el objetivo de este estudio es analizar, usando un modelo animal, si el trasplante de medula ósea de donantes con factores de riesgo cardiovascular aumenta el riesgo cardiovascular en receptores sanos.

Se extrajeron las células de la médula ósea de ratas con y sin acumulación de factores de riesgo cardiovascular (FRCV), y se trasplantaron a ratas sanas de la misma edad. Catorce semanas tras el trasplante, y tras administrar dieta con alto contenido en grasa, se analizó el perfil metabólico de los receptores.

Nuestros resultados demostraron que la médula ósea de donantes con FRCV inducen modificaciones pro-aterogénicas en el perfil de colesterol de los receptores sanos, aumentando la fracción de lipoproteínas de baja densidad (LDL) en comparación con aquellos trasplantados con médula de animales control. Además, la médula ósea de donantes con FRCV indujo alteraciones significativas en la expresión de genes relacionados con el estado inflamatorio y el metabolismo lipídico en el hígado de los receptores, que pueden contribuir a alterar la homeostasis del colesterol.

Con todo, estos resultados sugieren que los FRCV en los donantes confieren una alteración cardiometabólica a sus células de la médula ósea que se transfiere a receptores sin enfermedad cardiovascular previa, afectando su función hepática e incrementando su riesgo cardiovascular.

American Journal of Transplantation 2016; XX: 1–12
Wiley Periodicals Inc.

© Copyright 2016 The American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons

doi: 10.1111/ajt.13962

Bone Marrow Cell Transplant From Donors With Cardiovascular Risk Factors Increases the Pro-atherosclerotic Phenotype in the Recipients

M. T. Bejar[1,†], R. Hernández-Vera[1,†], G. Vilahur[1] and L. Badimon[1,2,*]

[1]*Cardiovascular Research Center, CSIC-ICCC, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau (UAB) and IIB-Santpau, Barcelona, Spain*
[2]*Cardiovascular Research Chair, UAB, Barcelona, Spain*
**Corresponding author: Lina Badimon, lbadimon@csic-iccc.org*
[†]These authors contributed equally to this work.

Improvement of long-term survival after hematopoietic stem cell transplantation has revealed that these patients have an increased appearance of *de novo* cardiovascular risk factors. Even though in these clinical studies no relation to transplant-related factors has been found, no attention has been paid to the influence of cardiovascular risk factors affecting the bone marrow donors on the cardiovascular risk of the recipients. Thus, the aim of this study was to analyze, using an animal model, whether transplantation of bone marrow from donors with cardiovascular risk factors increases cardiovascular risk in healthy recipients. Results from transplantation experiments have shown that bone marrow from donors with cardiovascular risk factors induced pro-atherogenic modifications in the cholesterol profile of healthy recipients, increasing the low-density lipoprotein cholesterol fraction in comparison to those transplanted with control bone marrow. Moreover, bone marrow from donors with cardiovascular risk factors induced significant alterations in liver pro-inflammatory state and lipid metabolism–related gene expression that could contribute to alter cholesterol homeostasis. Altogether, these results suggest that cardiovascular risk factors in the donor confer a cardiometabolic alteration to their bone marrow cells that is transferred to noncardiovascular disease transplant recipients, affecting their liver function and increasing their cardiovascular risk.

Abbreviations: AFI, abdominal fat index; BMC, bone marrow cells; CE, cholesteryl ester; CVRF, cardiovascular risk factors; F×R, farnesoid × receptor; FC, free cholesterol; GOT, glutamic-oxaloacetic transaminase; GPT, glutamic-pyruvic transaminase; HF, high-fat diet; HSCT, hematopoietic stem cell transplantation; PBMNC, peripheral blood mononuclear cells; PCR, polymerase chain reaction; R×R, retinoid × receptor; REG, regular diet; TG, triglycerides; TNF, tumor necrosis factor; ZC, Zucker lean normoglycemic control rats; ZD, Zucker diabetic fatty rats

Received 15 April 2016, revised 17 June 2016 and accepted for publication 10 July 2016

Introduction

Hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) has become the treatment of choice for various malignant and nonmalignant hematological diseases (1). As a consequence, HSCT methods and supportive-care strategies have been improved, resulting in an increase in long-term survivors. However, with the improvement in survival rates concerns have been raised regarding late event occurrence related to HSCT and the long-term health status of these patients (2–4).

Evidence of premature cardiovascular event occurrence in HSCT survivors first appeared as isolated case reports (5–7). However, various studies analyzing the presence of cardiovascular risk factors (CVRF) and the risk of cardiovascular disease in long-term survivors of HSCT have recently been published (8–13). Results from these studies have shown that HSCT survivors have an increased risk of developing metabolic syndrome compared to the normal population (8,10,11) and are likely to suffer premature cardiovascular events (13). Furthermore, several of these studies have shown an increase in the appearance of *de novo* CVRF in HSCT survivors who received allogenic transplants (9,11,12). Nevertheless, results from these studies have been contradictory, as some of them have observed associations between transplant-related factors and an increased appearance of some CVRF (total body irradiation was associated with increased risk of developing diabetes [9] and chronic graft-versus-host disease with hypertension [10]), while others have found no association of transplant-related factors with cardiovascular risk (11–13).

Recently, various conditions in the recipients (e.g. total body irradiation, endocrine dysfunctions, hypothyroidism, and gonadal dysfunction) have been proposed as causes of the increased cardiovascular risk observed in HSCT survivors (14,15). However, no attention has been paid to the fact that the presence of CVRF in the bone

marrow donors might also contribute to increase cardiovascular risk in the recipients.

Previously, traditional CVRF such as diabetes, hypercholesterolemia, obesity, and hypertension have been shown to affect cell function and activity in animal models (16,17) as well as in humans (18–20), and patient-derived bone marrow cells have been proven to be functionally impaired compared to those of healthy controls (21–23). In fact, cell therapy clinical trials using autologous bone marrow cells to improve myocardial function in heart failure or after infarction (24–26) have failed to reproduce the promising results obtained in healthy mouse models and in studies performed with cells from healthy subjects (27–29). Moreover, we have described in a rat model that hypercholesterolemia and obesity with insulin resistance (with and without type 2 diabetes) induces alterations in bone marrow cells that transfer an increased thrombotic risk to transplanted healthy recipients (30,31). Therefore, the aim of this study was to analyze, in an animal model, whether transplantation of bone marrow cells from donors with clustering of CVRF affects cardiovascular risk in healthy recipients.

Materials and Methods

Animals

Sixteen 12-week-old Zucker lean normoglycemic control rats (ZC) received bone marrow transplants, eight from age-matched Zucker diabetic fatty rats (ZD) and the other eight from age-matched ZC donors. Both transplanted groups were fed with LabDiet® 5008 chow (regular) (PMI Nutrition International, St Louis, MO) during a 5-week recovery period following transplantation after which they were fed with a high-fat diet (HF) (high-fat; TestDiet® 58R6; PMI Nutrition International) for 9 weeks. Additionally, sixteen 12-week-old ZC rats were divided into two groups (n = 8 per group); one was fed with regular chow for 14 weeks and the other, similarly to transplanted animals, was fed with regular chow for 5 weeks after which animals were fed with the HF for 9 weeks. A scheme of the study is shown in Figure 1.

All animals were purchased from Charles River Laboratories (Sain-Germain-sur-l'Arbresle, France). The study protocol was approved by the Animals Ethics Committee of our Institution (CSIC-ICCC). All animal procedures conform to the guidelines from Directive 2010/63/EU of the European Parliament on the protection of animals used for scientific purposes or the National Institutes of Health guidelines. In addition, we have followed the ARRIVE (Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments) guidelines (32) and committed to the 3Rs (Replacement, Reduction and Refinement) of laboratory animal research and consequently used the minimal number of animals to reach statistical significance.

Blood samples and biochemical parameters determination

Blood was collected in either 3.8% sodium citrate or serum-separation tubes. Blood collected in serum-separation tubes was incubated at 37°C to clot. Then, samples were centrifuged 15 min at 1800*g* at 4°C to collect serum, and samples were immediately frozen and stored for further analysis. Biochemical analyses of serum samples were performed with a CLIMA MC-15 analyzer (RAL, Barcelona, Spain).

Bone marrow transplants

Bone marrow transplants were performed following a procedure previously proven to produce an effective engraftment of donor bone marrow in the recipients (31). Receptors were immunosuppressed with a combined therapy consistent of cyclophosphamide and busulfan prior to transplantation. On transplant day, donor bone marrow was extracted from femurs and tibias and cells were injected to the recipients through the lateral tail vein. Transplanted animals received antibiotic treatment for 5 days after transplantation and hematological parameters were routinely analyzed to assess the effectiveness of the immunosuppressive treatment and posttransplantation recovery.

Determination of liver cholesteryl esters (CE), triglycerides (TG), and free cholesterol (FC)

Liver samples were extracted immediately after euthanasia, frozen in liquid nitrogen, and stored for further analysis. Liver lipids were extracted following Bligh and Dyer's method (33) with minor modifications (34,35). Samples were partitioned by thin-layer chromatography, and densitometry of spots corresponding to CE, TG, and FC was analyzed.

Gene expression analyses

Liver RNA was isolated and reverse-transcribed into cDNA using High Capacity cDNA Archive kit (Applied Biosystems, Foster City, CA). mRNA levels were analyzed by real-time polymerase chain reaction (PCR) using TaqMan gene expression assays (Applied Biosystems) and the Applied Biosystems Prism 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems) according to manufacturer's instructions. Expression analyses were normalized with Peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A). TaqMan gene expression assays are provided in Table S1.

Expression of 84 genes was analyzed with a rat-specific lipoprotein signaling PCR array (PARN-080A, SA Biosciences, San Diego, CA). Gene expression values obtained were normalized using five endogenous control genes included in the array and transformed to $2^{-\Delta Ct}$ prior to performing statistical analysis. Genes with low expression levels (mean Ct value >32) were excluded from the statistical analysis. Fold-changes were determined by the delta-delta-Ct method.

Tumor necrosis factor alpha (TNFα) and IL-1β measurements

Liver samples were homogenized, and suspended in 500 μL of lysis buffer containing protease inhibitor cocktail for 10 min. The homogenate was incubated for 30 min at 4°C in gentle agitation and then sonicated and centrifuged at 10 000*g* for 20 min at 4°C. IL-1β and TNFα levels were measured using the commercially available colorimetric enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits (TNF alpha Rat ELISA Kit ab100785; IL-1 beta Rat ELISA Kit ab; Abcam, Cambridge, UK). The procedure was performed according to the manufacturer's instructions. The results were expressed as microgram per milligram of total protein.

In silico *analysis*

Ingenuity® pathway analysis (IPA® version 14400082; Qiagen, Valencia, CA) software was used to identify canonical pathways and functions in which those genes significantly modified were involved. Genes showing a tendency toward significance ($p < 0.07$ and fold-change >1.2 or <−1.2) were also included in the *in silico* analysis (such genes are clearly identified when corresponding).

Statistical analysis

Results were expressed as mean ± SEM. Student t-test or one-way analysis of variance, as appropriate, were used to determine statistical significance between groups. Simple regression analyses were performed to determine correlations of mRNA expression levels. A $p < 0.05$ was considered significant.

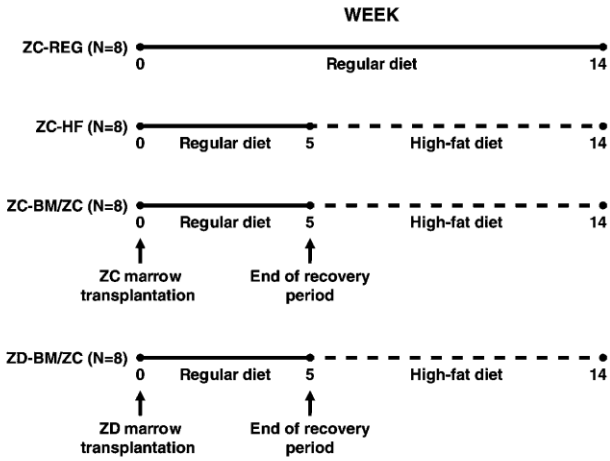


Figure 1: Study design. Sixteen 12-week-old Zucker lean normoglycemic control rats (ZC) received bone marrow (BM) transplants, eight from age-matched Zucker diabetic fatty rats (ZD) and the other eight from age-matched ZC donors. Transplanted animals were fed with LabDiet® 5008 chow (regular) for 5 weeks following transplantation after which they were fed with a high-fat diet (HF) (high-fat; TestDiet® 58R6) for 9 weeks. Additionally, 16 12-week-old ZC rats were divided into two groups (N = 8 per group). One was fed with regular chow for 14 weeks and the other was fed with regular chow (REG) for 5 weeks and then with the high-fat diet for 9 weeks.

A detailed version of the Methods section is provided in Data S1.

Results

Metabolic profile of bone marrow donors

Important differences were observed in the metabolic profile of bone marrow donors, as ZD donors were diabetic and obese compared to ZC donors (Table 1). ZD donors also showed a mixed dyslipidemia with increased TG, HDL, non-HDL, LDL and total cholesterol levels compared to those of ZC donors as well as a significantly increased total/HDL cholesterol ratio (Table 1).

Effects of HF on ZC rats

As shown in Table 2, no significant differences were observed in weight, BMI, or abdominal fat index (AFI) between ZC animals fed with the regular diet (ZC-REG) and those fed with the HF (ZC-HF). Similarly, the HF had no effect on glycemia, as no differences were observed in fasting blood glucose or glycosylated hemoglobin (HbA1c) levels between ZC-REG and ZC-HF. However, as expected, the HF induced modifications in the lipid profile as ZC-HF animals showed significantly increased total and non-HDL cholesterol levels compared to ZC-REG. Moreover, ZC-HF rats showed a 2.5-fold increase in the total/HDL cholesterol ratio and a threefold increase in the LDL/HDL cholesterol ratio compared to ZC-REG, thus reflecting a more pro-atherogenic profile (Table 2).

Table 1: Metabolic profile of bone marrow donors

Parameter	ZC	ZD
Age, weeks	12	12
Fasting blood glucose, mg/dL	87 ± 8	369 ± 41***
Weight, g	331 ± 11	351 ± 19*
Lipid profile		
Total cholesterol, mg/dL	84 ± 3	161 ± 3***
HDL cholesterol, mg/dL	58 ± 2	98 ± 6***
Non-HDL cholesterol, mg/dL	26 ± 2	63 ± 7***
LDL cholesterol, mg/dL	12 ± 0	20 ± 3*
Triglycerides, mg/dL	64 ± 11	155 ± 23**
Total/HDL cholesterol ratio	1.45 ± 0.03	1.69 ± 0.11*
LDL/HDL cholesterol ratio	0.21 ± 0.01	0.22 ± 0.04
Hepatic and renal function markers		
GOT, U/L	49 ± 4	67 ± 4**
GPT, U/L	31 ± 1	62 ± 5***
Creatinine, mg/dL	0.78 ± 0.03	0.82 ± 0.03
Urea, mg/dL	39 ± 2	51 ± 2***
Total proteins, g/dL	5.6 ± 0.1	5.9 ± 0.1

GOT, glutamic-oxaloacetic transaminase; GPT, glutamic-pyruvic transaminase; HDL, high-density lipoprotein; LDL, low-density lipoprotein; ZC, normoglycemic control rats; ZD, Zucker diabetic fatty rats.*$p < 0.05$ versus ZC; **$p < 0.01$ versus ZC; ***$p < 0.001$ versus ZC.

Analysis of the contribution of HDL, LDL, and the very low-density forms of cholesterol (VLDL) to total cholesterol (Figure 2A) confirmed the pro-atherogenic modification of

Table 2: Group characteristics

Parameter	ZC-REG	ZC-HF	ZC-BM/ZC	ZD-BM/ZC
Age at euthanasia (weeks)	26	26	26	26
Bone marrow transplant and chow				
Bone marrow transplant	No	No	Yes	Yes
Donor	–	–	ZC	ZD
Recipient	ZC	ZC	ZC	ZC
Chow	Regular	High fat	High fat	High fat
Glycemic status				
Fasting blood glucose, mg/dL	101 ± 2	98 ± 1	104 ± 4	101 ± 5
Glycated hemoglobin, %	5.8 ± 0.1	6.4 ± 0.0	5.9 ± 0.2	6.0 ± 0.1
Weight and body characteristics				
Weight, g	433 ± 7	468 ± 9	378 ± 20*,††	370 ± 21**,†††
Length, cm	25.1 ± 0.4	25.5 ± 0.4	23.7 ± 0.4*,††	23.5 ± 0.2**,†††
Width, cm	8.8 ± 0.2	9.5 ± 0.2	8.7 ± 0.3†	8.6 ± 0.4†
Body mass index, kg/m^2	7.0 ± 0.2	7.3 ± 0.3	6.6 ± 0.4	6.7 ± 0.3
Abdominal fat index	0.35 ± 0.01	0.37 ± 0.00	0.37 ± 0.01	0.37 ± 0.01
Lipid profile				
Total cholesterol, mg/dL	101 ± 3	187 ± 10***	201 ± 10***	197 ± 17***
HDL cholesterol, mg/dL	60 ± 3	45 ± 2***	57 ± 2††	60 ± 4††
Non-HDL cholesterol, mg/dL	40 ± 3	143 ± 8***	145 ± 9***	137 ± 17***
LDL cholesterol, mg/dL	14 ± 1	28 ± 2	36 ± 3	101 ± 15***,†††,‡‡
Triglycerides, mg/dL	125 ± 16	164 ± 27	121 ± 28	64 ± 9*,††
Total/HDL cholesterol ratio	1.7 ± 0.1	4.2 ± 0.1***	3.6 ± 0.2***	3.4 ± 0.4***,†
LDL/HDL cholesterol ratio	0.2 ± 0.0	0.6 ± 0.0*	0.6 ± 0.0*	1.7 ± 0.2***,†††,‡‡
Hepatic and renal function markers				
GOT, U/L	49 ± 4	68 ± 3*	77 ± 3**	85 ± 9***,†
GPT, U/L	26 ± 1	33 ± 2*	24 ± 1††	23 ± 3††
Creatinine, mg/dL	0.69 ± 0.05	0.67 ± 0.04	0.64 ± 0.04	0.80 ± 0.03†,‡
Urea, mg/dL	33 ± 1	28 ± 1**	24 ± 1***,†	23 ± 2***,†
Total proteins, g/dL	6.5 ± 0.1	7.1 ± 0.1**	6.8 ± 0.2	6.4 ± 0.1††

GOT, glutamic-oxaloacetic transaminase; GPT, glutamic-pyruvic transaminase; HDL, high-density lipoprotein; LDL, low-density lipoprotein; ZC-BM/ZC, normoglycemic control rats transplanted with bone marrow from ZC donors; ZC-HF, normoglycemic control rats fed with high-fat diet; ZC-REG, normoglycemic control rats fed with high-fat diet. *$p < 0.05$ versus ZC-REG, **$p < 0.01$ versus ZC-REG, ***$p < 0.001$ versus ZC-REG; $^{\dagger}p < 0.05$ versus ZC-HF, $^{\dagger\dagger}p < 0.01$ versus ZC-HF, $^{\dagger\dagger\dagger}p < 0.001$ versus ZC-HF; $^{\ddagger}p < 0.01$ versus ZC-BM/ZC, $^{\ddagger\ddagger}p < 0.001$ versus ZC-BM/ZC.

the cholesterol profile produced by the HF in ZC-HF animals. Indeed, the HF significantly reduced the HDL cholesterol fraction (ZC-REG: 60.0 ± 2.3%; ZC-HF: 24.0 ± 0.6%; $p < 0.0001$), and increased that of VLDL cholesterol (ZC-REG: 25.7 ± 1.9%; ZC-HF: 61.2 ± 1.0%; $p < 0.0001$) in ZC-HF compared to ZC-REG, while the LDL cholesterol fraction remained unaltered (ZC-REG: 14.3 ± 0.8%; ZC-HF: 14.8 ± 0.7%; $p = 0.9230$).

Besides the differences observed in blood lipid levels and cholesterol profiles between animals fed with both diets, the HF also produced a significant increase in serum glutamic-oxaloacetic transaminase (GOT), glutamic-pyruvic transaminase, and total protein levels as well as a significant decrease in urea levels in ZC-HF compared to ZC-REG (Table 2).

Effects of bone marrow transplantation on high-fat fed rats

Despite the differences in the metabolic profile of the donors, transplantation had no effect, regardless of marrow origin, on the recipients' glycemic status as no differences were observed in fasting blood glucose or HbA1c levels between transplanted and nontransplanted animals (Table 2). In line with these results, transplantation had no effects on the BMI or the AFI between transplanted and nontransplanted animals (Table 2), despite that both groups of transplanted animals showed significantly lower weights than nontransplanted animals (Table 2) as a consequence of the immunosuppressive treatment.

Similarly to that observed in ZC-HF, animals transplanted with ZC bone marrow and fed with the HF (ZC-BM/ZC) showed significantly increased total and non-HDL cholesterol levels and significantly increased total/HDL and LDL/HDL cholesterol ratios compared to ZC-REG (Table 2). In fact, the cholesterol profile observed in ZC-BM/ZC animals was very similar to that observed in ZC-HF, showing a reduced HDL cholesterol fraction (28.6 ± 1.8%, $p < 0.0001$), an increased VLDL cholesterol fraction (53.8 ± 1.8%, $p = 0.0005$), and an unaltered LDL

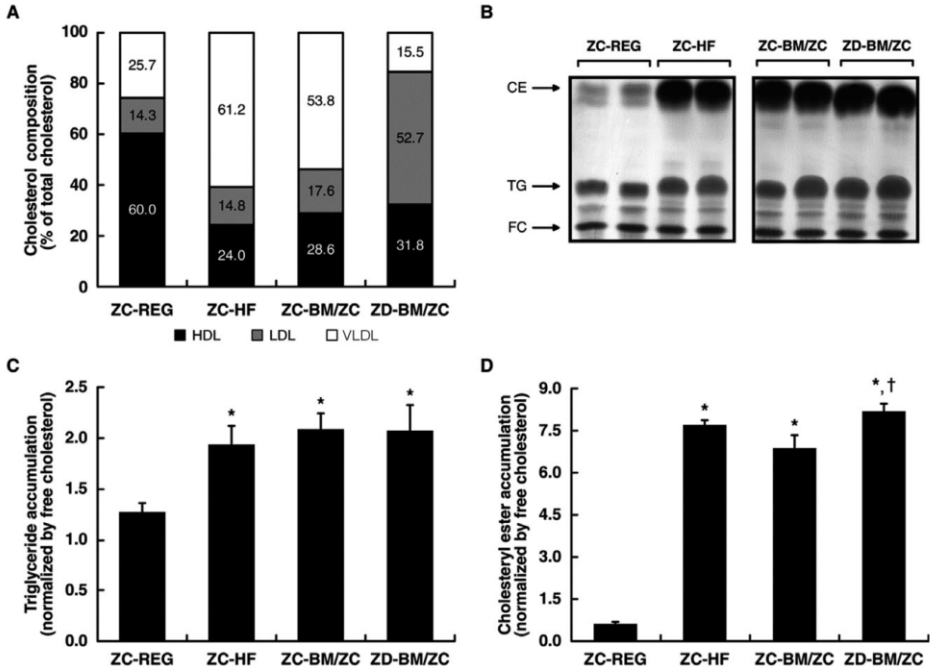


Figure 2: Cholesterol composition and lipid accumulation in the liver. (A) Cholesterol composition. High-fat diet (HF) reduced the low-density lipoprotein (LDL) cholesterol fraction and increased the very low-density lipoprotein (VLDL) fraction in Zucker lean normoglycemic control rats (ZC) fed with high-fat diet (ZC-HF) and in ZC transplanted with ZC bone marrow (BM) and fed with the high-fat diet (ZC-BM/ZC) compared to ZC fed with regular chow (ZC-REG). In contrast, ZC transplanted with Zucker diabetic fatty rats (ZD) bone marrow (ZD-BM/ZC) showed decreased high-density lipoprotein (HDL) and VLDL fractions with an increased LDL fraction compared to ZC-REG, ZC-HF, and ZC-BM/ZC. (B) Thin-layer chromatography of liver samples. Representative images of liver samples analyzed by thin layer chromatography. CE, cholesteryl esters; FC, free cholesterol; TG, triglycerides. (C) Accumulation of liver triglycerides. ZC-HF, ZC-BM/ZC, and ZD-BM/ZC showed significantly increased TG accumulation compared to ZC-REG. No differences were observed between transplanted ZC and ZC-HF, regardless of bone marrow origin, nor between ZC-BM/ZC and ZD-BM/ZC. (D) Liver CE accumulation. CE were increased in ZC-HF, ZC-BM/ZC, and ZD-BM/ZC compared to ZC-REG. A significant increase in CE accumulation was observed in ZD-BM/ZC compared to ZC-BM/ZC. *$p < 0.05$ versus ZC-REG, †$p < 0.05$ versus ZC-BM/ZC.

cholesterol fraction (17.6 ± 0.7%, $p = 0.5373$) compared to ZC-REG (Figure 2A).

On the other hand, animals transplanted with bone marrow from ZD donors and fed with the HF (ZD-BM/ZC) also showed increased total and non-HDL cholesterol levels compared to ZC-REG (Table 2). However, the most important difference was that ZD-BM/ZC rats showed a highly significant increase in LDL cholesterol levels compared to those of ZC-REG, ZC-HF, and ZC-BM/ZC (7.2, 3.6, and 2.8-fold increase, respectively). Additionally, they had significantly reduced triglyceride levels compared to ZC-REG and ZC-HF, and a nearly significant reduction of TG compared to ZC-BM/ZC ($p = 0.06$) (Table 2). Such a difference was confirmed by analyzing the cholesterol profile of this group (Figure 2), as ZD-BM/ZC animals showed a significantly increased LDL fraction (52.7 ± 7.2%) compared to ZC-REG, ZC-HF, and ZC-BM/ZC (14.3 ± 0.8%, 14.8 ± 0.7%, and 17.6 ± 0.7%, respectively; $p < 0.0001$ vs. all three groups) and a significantly reduced VLDL fraction (15.5 ± 9.5%) compared to ZC-HF and ZC-BM/ZC (61.2 ± 1.0% and 53.8 ± 1.8%, respectively; $p < 0.0001$ vs. both groups). Moreover, this pro-atherogenic modification of the lipid profile was also reflected by a nearly threefold increase in the LDL/HDL cholesterol ratio in ZD-BM/ZC compared to both ZC-HF and ZC-BM/ZC (Table 2).

Similarly to ZC-HF, both transplanted groups showed significantly higher GOT levels compared to ZC-REG. Interestingly, ZD-BM/ZC showed significantly higher creatinine levels compared to ZC-HF and ZC-BM/ZC (Table 2).

CE and TG accumulation in the liver

Thin-layer chromatography of liver samples (Figure 2B) revealed that the HF induced a significant increase in accumulation of TG and CE compared to the regular diet (Figures 2C and D, respectively). However, bone marrow transplantation showed no effects on liver TG levels, as both transplanted groups (ZC-BM/ZC and ZD-BM/ZC) showed similar levels compared to ZC-HF (Figure 2C). In contrast, CE levels observed in the liver of ZD-BM/ZC animals were significantly higher than those observed in ZC-BM/ZC (Figure 2D).

Effect of bone marrow origin on liver gene expression

Given that bone marrow from donors with CVRF produced pro-atherogenic modifications on the cholesterol profile of healthy recipients, we analyzed the expression of genes related to lipoprotein signaling in the liver of both groups of transplanted animals (Figure 3A, Table S2).

In silico analysis of gene expression data revealed significantly modified canonical pathways in ZD-BM/ZC compared to ZC-BM/ZC including Farnesoid × receptor (F×R)/Retinoid × receptor (R×R) and Liver × receptor (L×R)/R×R activation, which are involved in the regulation of lipid metabolism, inflammation, and cholesterol to bile acid catabolism (Figure 3B). On the other hand, the differential gene expression observed in the liver of ZD-BM/ZC and ZC-BM/ZC rats appeared significantly associated with biological functions such as metabolism of cholesterol, lipid accumulation, and interestingly, inflammatory response (Table 3).

Inflammatory cytokines in liver of transplanted animals

Regarding the alterations in inflammatory response found in the liver of rats that received bone marrow transplant from obese and diabetic animals, and their higher levels of GOT and creatinine compared to rats transplanted with bone marrow from healthy donors, we analyzed the presence of the pro-inflammatory cytokines IL-1β and TNFα in the livers of transplanted rats. We found a 1.7- and 3.1-fold increase of IL-1β and TNFα levels in the livers of ZD-BM/ZC animals compared to ZC-BM/ZC, confirming a pro-inflammatory state in those animals (Figure 4).

Macrophage-related gene expression in liver

A pro-inflammatory state is usually associated with an increased homing of inflammatory cells; therefore, we analyzed the expression of the macrophage markers *Cd68* and *Cd163* in the liver of the four groups of the study. Expression of both macrophage markers was increased in ZC-HF and ZD-BM/ZC compared to ZC-REG. Moreover, ZD-BM/ZC showed significantly higher levels of *Cd163* expression compared to ZC-BM/ZC (Figure 5A). The analysis of macrophage's lipid metabolism-related genes showed an increased expression of Fatty acid binding protein 4 (*Fabp4*) and Lipoprotein lipase (*Lpl*) in the liver of ZD-BM/ZC rats compared to the other groups.

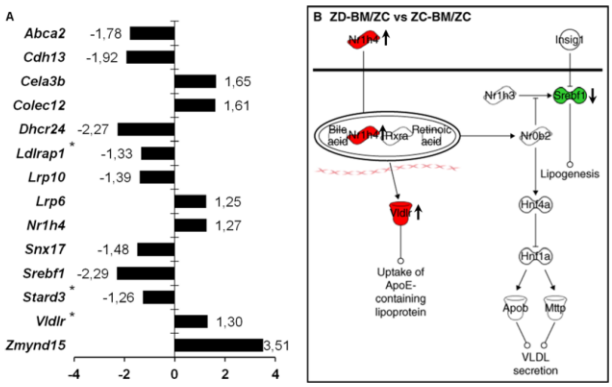


Figure 3: Alterations in liver gene expression. (A) Genes significantly modified in ZD-BM/ZC compared to ZC-BM/ZC. Data are expressed as fold change relative to ZC-BM/ZC. (B) F×R/R×R activation pathway – role of Nr1h4 (F×R) in lipoprotein and lipid metabolism. Significantly modified genes are highlighted. Arrows indicate up-regulation or down-regulation of genes in ZD-BM/ZC. *Genes with $p < 0.07$ and fold-change >1.2 or <−1.2 included in the *in silico* analysis. VLDL, very low-density lipoprotein. BM, bone marrow; F×R, farnesoid × receptor; R×R, retinoid × receptor; VLDL, very low-density lipoprotein; ZC, Zucker lean normoglycemic control rats; ZD, Zucker diabetic fatty rats.

Table 3: Significantly modified canonical pathways and bio functions in which modified genes are involved

ZD-BM/ZC versus ZC-BM/ZC	p-value	Modified genes involved
Canonical pathways		
F×R/R×R activation	<0.0001	Nr1h4, Srebf1, VLDLr*
L×R/R×R activation	0.0029	Nr1h4, Srebf1
Hepatic cholestasis	0.0051	Nr1h4, Srebf1
Bio functions		
Metabolism of cholesterol	<0.0001	Cela3b, Dhcr24, Srebf1, Stard3*
Disorder of lipid metabolism	<0.0001	Ldlrap1*, Nr1h4, Srebf1, VLDLr*
Accumulation of lipid	0.00019	Abca2, Nr1h4, Srebf1
Inflammatory response	0.01310	Cdh13, Cela3b, Nr1h4

F×R/R×R, farnesoid × receptor/retinoid × receptor; L×R, liver × receptor; ZC-BM/ZC, normoglycemic control rats transplanted with bone marrow from ZC donors; ZD-BM/ZC, normoglycemic control rats transplanted with bone marrow from ZD donors.
*Genes with $p < 0.07$ and fold-change >1.2 or <−1.2 included in the *in silico* analysis.

Cd36 was increased in high-fat fed animals, though it only reached statistical significance in ZC-HF rats. Surprisingly, Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (*Pparγ*), regulator of the above genes, did not show different gene expression among groups (Figure 5B).

Gene expression levels of *Cd68* and *Cd163* were positively correlated to *Cd36*, *Fabp4*, and *Lpl* expression (Figure S1), while no association of the macrophage markers was found with *Pparγ* expression (data not shown).

Inflammatory state of bone marrow cells (BMC) in donors

In order to elucidate whether the pro-inflammatory state of ZD-BM/ZC livers could be a direct consequence of the received BMCs, we analyzed in these cells the gene expression of the inflammasome component *Nlrp3*, *Cd14*, and the two inflammatory cytokines found altered in ZD-BM/ZC livers. All those molecules were found to be upregulated in ZD donors with a 1.8- and 1.7-fold increase in *Il-1β* and *Tnfα*, respectively. Interestingly, peripheral blood mononuclear cells (PBMNCs) of ZD donor animals showed high levels of *Il-1β* and *Tnfα*, with 15.5- and 6-fold increase compared to ZC rats (Figure 6).

Discussion

In this study we have shown, for the first time to our knowledge, that the presence of CVRF in bone marrow donors can contribute to increase cardiovascular risk in the recipients by altering the liver's inflammatory state and thereby the liver's gene expression, inducing pro-atherogenic modifications in their cholesterol profile.

In recent years, various clinical studies performed in long-term HSCT survivors have shown that these patients present an increased risk of developing metabolic syndrome (8,11) and are likely to suffer premature cardiovascular events (13). Moreover, some of these studies have described an increase in the appearance of *de novo* CVRF in allogenic-HSCT survivors (9,11,12). However, results from these studies are controversial regarding the association of transplant-related factors (e.g. acute or chronic graft-versus-host disease occurrence, conditioning regimen used, etc.) with cardiovascular risk; and even though total body irradiation and some common complications of HSCT have recently been proposed as causes of the increased cardiovascular risk observed in HSCT survivors (14,15), there are still no mechanistic evidences to support these observations.

The presence of CVRF in bone marrow donors is an important aspect that may contribute to increase cardiovascular risk in HSCT survivors and that has so far been

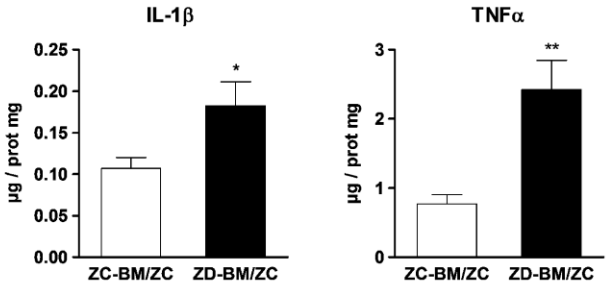


Figure 4: IL-1β and TNFα protein levels in liver of transplanted animals. At the end of the study, ZD-BM/ZC rats showed higher levels of the inflammatory cytokines IL-1β and TNFα in the liver compared to ZC-BM/ZC animals. *$p < 0.05$; **$p < 0.01$. TNF, tumor necrosis factor; ZC, Zucker lean normoglycemic control rats; ZD, Zucker diabetic fatty rats.

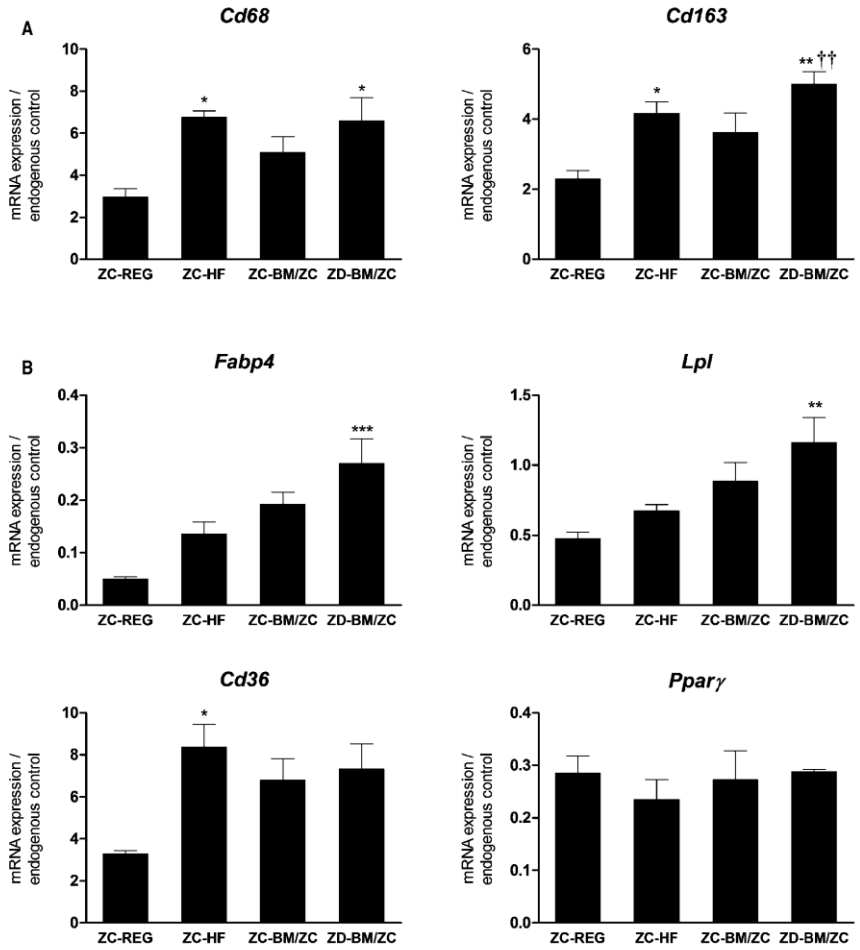


Figure 5: Gene expression of macrophage-related genes in the liver. (A) Macrophage markers CD68 and CD163 gene expression. (B) Lipid metabolism-related gene expression. *$p < 0.05$ versus ZC-REG; **$p < 0.01$ versus ZC-REG; ***$p < 0.001$ versus ZC-REG; $^{\dagger\dagger}p < 0.01$ versus ZC-BM/ZC. ZC-REG, Zucker lean normoglycemic control rats fed with regular chow; ZC-BM/ZC, ZC transplanted with ZC bone marrow (BM) and fed with the high-fat diet.

overlooked. We have previously described that, in rats, obesity with insulin resistance and hypercholesterolemia induces alterations in these cells that are transferred to healthy recipients by transplantation, increasing their thrombotic risk (30,31). Thus, in this study we tested the hypothesis that the metabolic status of bone marrow donors contributed to increase cardiovascular risk in bone marrow transplant recipients.

Results from the studies reported herein provide evidence to support a detrimental role exerted by CVRF on the donor bone marrow cells that is translated to an

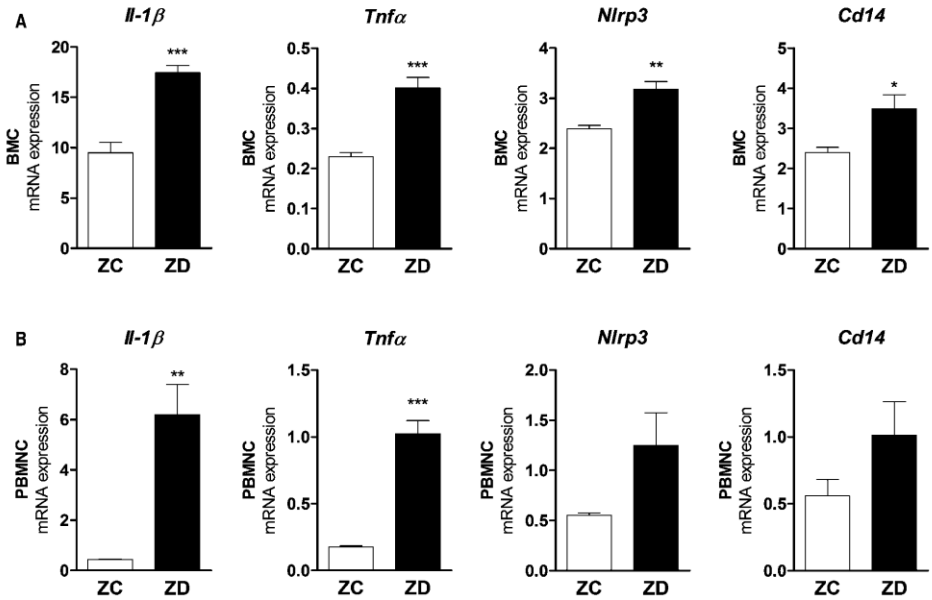


Figure 6: Inflammasome-related gene expression in donors. (A) Bone marrow cells (BMC) from ZC and ZD donors gene expression. (B) Peripheral blood mononuclear cells (PBMNC) from ZC and ZD donors gene expression. *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001. ZC, Zucker lean normoglycemic control rats; ZD, Zucker diabetic fatty rats.

increased cardiovascular risk in HSCT survivors because intriguingly, bone marrow from donors clustering CVRF produced pro-atherogenic modifications in the cholesterol profile of healthy recipients, significantly increasing their LDL cholesterol fraction, in comparison to animals transplanted with bone marrow from healthy donors. Surprisingly, these alterations in blood lipid levels were observed after only 9 weeks on a HF and as early as 14 weeks after transplantation.

The liver plays a key role in lipid metabolism, hence a thorough analysis of the liver of transplanted animals was essential to understand the mechanisms by which engrafted bone marrow cells could modify the lipoprotein profile of recipients. Bone marrow from donors with CVRF produced significant alterations in the F×R/R×R activation pathway in ZD-BM/ZC livers compared to ZC-BM/ZC, which can contribute to explaining the differences observed in lipid profiles between these groups. *Nr1h4* (also known as F×R) is a sensor for endogenous bile acids and is the master regulator of bile acid physiology as it regulates synthesis, transport, and refilling of the gallbladder (36,37). Nevertheless, *Nr1h4* also plays an important role in the regulation of lipid metabolism (38–40). Nr1h4 activation increases the expression of *Nr0b2,* which in turn reduces the expression of *Srebf1* and its lipogenic target genes (41). Therefore, the increased expression of *Nr1h4* and *Vldlr* observed in the liver of healthy recipients transplanted with bone marrow from donors with CVRF can contribute to explaining the reduction of the VLDL cholesterol fraction observed in these animals compared to ZC-BM/ZC.

Interestingly, the *in silico* analysis of gene expression data suggested alterations in the inflammatory response that were confirmed by the detection of significantly higher levels of the pro-inflammatory cytokines IL-1β and TNFα in the liver of ZD-BM recipients.

Kupffer cells are resident macrophages of the liver that when activated produce inflammatory cytokines, including IL-1β and TNFα, that mediate diverse metabolic effects by a paracrine action (42). Subsequent analysis showed that HF leads to an increased gene expression of macrophage's markers in the liver of ZC-HF and ZD-BM/ZC animals, suggesting an active recruitment of pro-inflammatory cells. Neither CD68 nor CD163 markers were significantly increased in ZC-BM/ZC compared

to ZC-REG rats. It should be noted that transplanted animals received immunosuppressive therapy prior to transplantation, thus the myeloablative and immunosuppressive effect of cyclophosphamide and busulfan combination should have maintained a low inflammatory response in those treated rats (43,44). Therefore, differences found in activation of immune cells in ZD-BM/ZC and ZC-BM/ZC rats (treated both with immunosuppressive therapy followed by HF) are related to the received bone marrow transplantation.

CVRF such as type 2 diabetes and obesity are associated with chronic inflammation. Our results on inflammasome-related gene expression evidenced a pro-inflammatory activation of BMCs in ZD compared to ZC donors, which is transferred to PBMNCs. These findings suggest that homing of bone marrow derived–macrophages/Kupffer cells to the liver could be the origin of the increased IL-1β and TNFα levels.

Moreover, direct correlations observed between macrophage markers (*Cd68* and *Cd163*) and *Lpl*, *Fabp4*, and *Cd36* expression levels support a relationship between inflammatory cell infiltration and the impairment of liver lipid homeostasis observed in ZD-BM/ZC. FABP4 is involved in several macrophage functions, including coordinating cholesterol trafficking, inflammatory activity and endoplasmic reticulum stress, and in line with our results, it has been previously correlated with CD68 and CD163 mRNA levels in a monocyte/macrophage lineage (45). On the other hand, LPL catalyses the hydrolysis of lipoprotein TG and since rodents lack CE transport protein its significant increased expression found in ZD-BM/ZC can contribute to explain the higher levels of LDL in those rats. Moreover, LPL could increase atherosclerotic risk by acting as a bridge between proteoglycans and lipoprotein receptors, such as LDL receptors, to induce the retention and uptake of atherogenic lipoproteins by cells within the vascular wall (46,47).

PPARγ is a master regulator of adipogenesis and acts as a transcription factor of CD36, FABP4, and LPL in mature adipocytes (48); however, no differences in liver mRNA expression were found between groups, suggesting the presence of alternative activation pathways of the latter genes. Previous studies in liver steatosis have shown that inflammatory cytokines can regulate lipid metabolism of hepatocytes *in vitro* and that macrophage/Kupffer cell–derived cytokines have a stimulatory effect on lipid accumulation mediated by IL-1β (49,50).

Our findings suggest that bone marrow cell transplants from donors that have a clustering of CVRF induce homing and/or activation of pro-inflammatory macrophages into the liver. These innate immune cells release pro-inflammatory

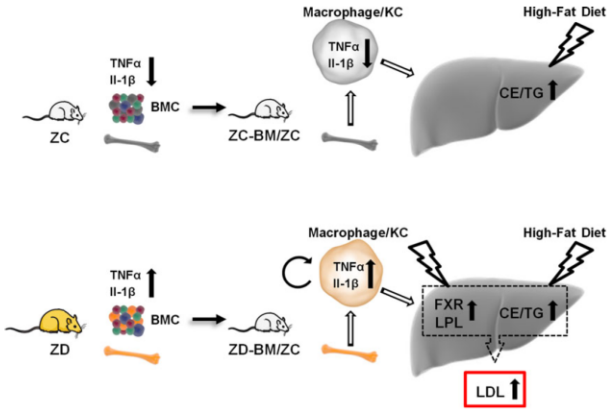


Figure 7: Schematic representation of the proposed mechanism by which ZD donors transfer cardiovascular risk to recipients of bone marrow transplant. High-fat diet produced cholesteryl esters (CE) and triglycerides (TG) accumulation in the liver. Bone marrow cells from donors clustering cardiovascular risk factors (ZD) provided activated pro-inflammatory macrophages/Kupffer cells that after homing in the liver of recipients (ZD-BM/ZC) released pro-inflammatory cytokines, triggering changes in lipid metabolism–related genes (LPL and F×R/R×R pathway), leading to a significant increase of pro-atherogenic lipoproteins (LDL). BMC, bone marrow cells; CE, cholesteryl esters; TG, triglycerides; F×R, farnesoid × receptor or Nr1h4; KC, Kupffer cells; LDL, low-density lipoprotein; LPL, lipoprotein lipase; TNFα, tumor necrosis factor-α; ZC, normoglycemic control rats; ZD, Zucker diabetic fatty rats; ZC-BM/ZC, normoglycemic control rats transplanted with bone marrow from ZC donors; ZD-BM/ZC, normoglycemic control rats transplanted with bone marrow from ZD donors.

cytokines, triggering changes in lipid metabolism–related genes in the liver through alterations in F×R/R×R pathway and increased expression of LPL, thus leading to a significant increase of pro-atherogenic lipoproteins (Figure 7). Thus, in line with previous observations in which BMCs from obese donors transferred a pro-thrombotic phenotype to healthy recipients (30), we described here, in a similar way, the transference of a pro-inflammatory state to healthy recipients from donors clustering CVRF.

It deserves to be acknowledged that our transplantation model is more similar to syngenic rather than to allogenic transplants, as transplanted animals only received immunosuppressive therapy prior to transplantation and did not develop graft-versus-host disease. However, results from this study provide solid evidences to suggest that the presence of CVRF in bone marrow donors can contribute to increase cardiovascular risk in healthy recipients by inducing a pro-inflammatory state in the liver and thus leading to pro-atherogenic modifications in their lipid profile. Even though the mechanisms behind these alterations are complex and will require further studies to be fully understood, these results are of great clinical relevance as they open a new line of investigation to determine the causes of increased cardiovascular risk observed in HSCT survivors.

Acknowledgments

The authors would like to thank Josep Moreno for his technical help. This studied was funded by the Spanish Ministry of Health–Instituto de Salud Carlos III (RETIC TERCEL RD/06/0010/0017 and Red de Investigación Cardiovascular RD/12/0042/0027 to L.B.); the Spanish Ministry of Science and Innovation (SAF2013-42962-R to L.B.; SAF2015-71653-R to G.V.); and Fundación de Investigación Cardiovascular-Fundación Jesús Serra. M.T.B. was granted with a pre-doctoral fellowship from the Catalan Government (FI-DGR2013). R.H.V. was granted with a fellowship from the Spanish National Research Council (JAE, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)).

Disclosure

The authors of this manuscript have no conflicts of interest to disclose as described by the *American Journal of Transplantation*.

References

1. Copelan EA. Hematopoietic stem-cell transplantation. N Engl J Med 2006; 354: 1813–1826.
2. Baker KS, Gurney JG, Ness KK, et al. Late effects in survivors of chronic myeloid leukemia treated with hematopoietic cell transplantation: Results from the bone marrow transplant survivor study. Blood 2004; 104: 1898–1906.
3. Socie G, Salooja N, Cohen A, et al. Nonmalignant late effects after allogeneic stem cell transplantation. Blood 2003; 101: 3373–3385.
4. Syrjala KL, Langer SL, Abrams JR, Storer BE, Martin PJ. Late effects of hematopoietic cell transplantation among 10-year adult survivors compared with case-matched controls. J Clin Oncol 2005; 23: 6596–6606.
5. Gatt ME, Liebster D, Leibowitz D, Matzner Y. Acute myocardial infarction after bone marrow transplantation: An unsuspected late complication. Ann Hematol 2003; 82: 136–138.
6. Ghobrial IM, Bunch TJ, Caplice NM, Edwards WD, Miller DV, Litzow MR. Fatal coronary artery disease after unrelated donor bone marrow transplantation. Mayo Clin Proc 2004; 79: 403–406.
7. Uchida N, Taniguchi S, Harada N, Shibuya T. Myocardial ischemia following allogeneic bone marrow transplantation: Possible implication of tacrolimus overdose. Blood 2000; 96: 370–372.
8. Annaloro C, Usardi P, Airaghi L, et al. Prevalence of metabolic syndrome in long-term survivors of hematopoietic stem cell transplantation. Bone Marrow Transplant 2008; 41: 797–804.
9. Baker KS, Ness KK, Steinberger J, et al. Diabetes, hypertension, and cardiovascular events in survivors of hematopoietic cell transplantation: A report from the bone marrow transplantation survivor study. Blood 2007; 109: 1765–1772.
10. Chow EJ, Mueller BA, Baker KS, et al. Cardiovascular hospitalizations and mortality among recipients of hematopoietic stem cell transplantation. Ann Intern Med 2011; 155: 21–32.
11. Majhail NS, Flowers ME, Ness KK, et al. High prevalence of metabolic syndrome after allogeneic hematopoietic cell transplantation. Bone Marrow Transplant 2009; 43: 49–54.
12. Tichelli A, Bucher C, Rovo A, et al. Premature cardiovascular disease after allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation. Blood 2007; 110: 3463–3471.
13. Tichelli A, Passweg J, Wojcik D, et al. Late cardiovascular events after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: A retrospective multicenter study of the Late Effects Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. Haematologica 2008; 93: 1203–1210.
14. Baker KS, Chow E, Steinberger J. Metabolic syndrome and cardiovascular risk in survivors after hematopoietic cell transplantation. Bone Marrow Transplant 2012; 47: 619–625.
15. Rovo A, Tichelli A. Cardiovascular complications in long-term survivors after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. Semin Hematol 2012; 49: 25–34.
16. Awad O, Jiao C, Ma N, Dunnwald M, Schatteman GC. Obese diabetic mouse environment differentially affects primitive and monocytic endothelial cell progenitors. Stem Cells 2005; 23: 575–583.
17. Stepanovic V, Awad O, Jiao C, Dunnwald M, Schatteman GC. Leprdb diabetic mouse bone marrow cells inhibit skin wound vascularization but promote wound healing. Circ Res 2003; 92: 1247–1253.
18. Pirro M, Schillaci G, Menecali C, et al. Reduced number of circulating endothelial progenitors and HOXA9 expression in CD34 + cells of hypertensive patients. J Hypertens 2007; 25: 2093–2099.
19. Onate B, Vilahur G, Camino-Lopez S, et al. Stem cells isolated from adipose tissue of obese patients show changes in their transcriptomic profile that indicate loss in stemcellness and increased commitment to an adipocyte-like phenotype. BMC Genom 2013; 14: 625.
20. Onate B, Vilahur G, Ferrer-Lorente R, et al. The subcutaneous adipose tissue reservoir of functionally active stem cells is reduced in obese patients. FASEB J 2012; 26: 4327–4336.
21. Dimmeler S, Leri A. Aging and disease as modifiers of efficacy of cell therapy. Circ Res 2008; 102: 1319–1330.

22. Heeschen C, Lehmann R, Honold J, et al. Profoundly reduced neovascularization capacity of bone marrow mononuclear cells derived from patients with chronic ischemic heart disease. Circulation 2004; 109: 1615–1622.
23. Tepper OM, Galiano RD, Capla JM, et al. Human endothelial progenitor cells from type II diabetics exhibit impaired proliferation, adhesion, and incorporation into vascular structures. Circulation 2002; 106: 2781–2786.
24. Janssens S, Dubois C, Bogaert J, et al. Autologous bone marrow-derived stem-cell transfer in patients with ST-segment elevation myocardial infarction: Double-blind, randomised controlled trial. Lancet 2006; 367: 113–121.
25. Strauer BE, Brehm M, Zeus T, et al. Regeneration of human infarcted heart muscle by intracoronary autologous bone marrow cell transplantation in chronic coronary artery disease: The IACT Study. J Am Coll Cardiol 2005; 46: 1651–1658.
26. Wollert KC, Meyer GP, Lotz J, et al. Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: The BOOST randomised controlled clinical trial. Lancet 2004; 364: 141–148.
27. Abdel-Latif A, Bolli R, Tleyjeh IM, et al. Adult bone marrow-derived cells for cardiac repair: A systematic review and meta-analysis. Arch Intern Med 2007; 167: 989–997.
28. Dimmeler S, Zeiher AM. Cell therapy of acute myocardial infarction: Open questions. Cardiology 2009; 113: 155–160.
29. Martin-Rendon E, Brunskill SJ, Hyde CJ, Stanworth SJ, Mathur A, Watt SM. Autologous bone marrow stem cells to treat acute myocardial infarction: A systematic review. Eur Heart J 2008; 29: 1807–1818.
30. Hernandez Vera R, Vilahur G, Badimon L. Obesity with insulin resistance increase thrombosis in wild-type and bone marrow-transplanted Zucker fatty rats. Thromb Haemost 2013; 109: 319–327.
31. Hernández Vera R, Vilahur G, Ferrer-Lorente R, Pena E, Badimon L. Platelets derived from the bone marrow of diabetic animals show dysregulated endoplasmic reticulum stress proteins that contribute to increased thrombosis. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2012; 32: 2141–2148.
32. Kilkenny C, Browne WJ, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG. Improving bioscience research reporting: The ARRIVE guidelines for reporting animal research. PLoS Biol 2010; 8: e1000412.
33. Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. Can J Biochem Physiol 1959; 37: 911–917.
34. Llorente-Cortes V, Costales P, Bernues J, Camino-Lopez S, Badimon L. Sterol regulatory element-binding protein-2 negatively regulates low density lipoprotein receptor-related protein transcription. J Mol Biol 2006; 359: 950–960.
35. Llorente-Cortes V, Otero-Vinas M, Sanchez S, Rodriguez C, Badimon L. Low-density lipoprotein upregulates low-density lipoprotein receptor-related protein expression in vascular smooth muscle cells: Possible involvement of sterol regulatory element binding protein-2-dependent mechanism. Circulation 2002; 106: 3104–3110.
36. Kemper JK. Regulation of F×R transcriptional activity in health and disease: Emerging roles of F×R cofactors and post-translational modifications. Biochim Biophys Acta 2011; 1812: 842–850.
37. Wollam J, Antebi A. Sterol regulation of metabolism, homeostasis, and development. Annu Rev Biochem 2011; 80: 885–916.
38. Cariou B, Staels B. F×R: A promising target for the metabolic syndrome? Trends Pharmacol Sci 2007; 28: 236–243.
39. Fiorucci S, Mencarelli A, Palladino G, Cipriani S. Bile-acid-activated receptors: Targeting TGR5 and farnesoid-X-receptor in lipid and glucose disorders. Trends Pharmacol Sci 2009; 30: 570–580.
40. Scotti E, Gilardi F, Godio C, et al. Bile acids and their signaling pathways: Eclectic regulators of diverse cellular functions. Cell Mol Life Sci 2007; 64: 2477–2491.
41. Watanabe M, Houten SM, Wang L, et al. Bile acids lower triglyceride levels via a pathway involving F×R, SHP, and SREBP-1c. J Clin Invest 2004; 113: 1408–1418.
42. Decker K. Biologically active products of stimulated liver macrophages (Kupffer cells). Eur J Biochem 1990; 192: 245–261.
43. Nilsson C, Forsman J, Hassan Z, et al. Effect of altering administration order of busulphan and cyclophosphamide on the myeloablative and immunosuppressive properties of the conditioning regimen in mice. Exp Hematol 2005; 33: 380–387.
44. Smith SR, Terminelli C, Kenworthy-Bott L, Phillips DL. A study of cytokine production in acute graft-vs-host disease. Cell Immunol 1991; 134: 336–348.
45. Agardh HE, Folkersen L, Ekstrand J, et al. Expression of fatty acid-binding protein 4/aP2 is correlated with plaque instability in carotid atherosclerosis. J Intern Med 2011; 269: 200–210.
46. Beisiegel U. New aspects on the role of plasma lipases in lipoprotein catabolism and atherosclerosis. Atherosclerosis 1996; 124: 1–8.
47. Ishibashi S, Yamada N, Shimano H, et al. Apolipoprotein E and lipoprotein lipase secreted from human monocyte-derived macrophages modulate very low density lipoprotein uptake. J Biol Chem 1990; 265: 3040–3047.
48. Tontonoz P, Spiegelman BM. Fat and beyond: The diverse biology of PPARgamma. Annu Rev Biochem 2008; 77: 289–312.
49. Ma KL, Ruan XZ, Powis SH, Chen Y, Moorhead JF, Varghese Z. Inflammatory stress exacerbates lipid accumulation in hepatic cells and fatty livers of apolipoprotein E knockout mice. Hepatology 2008; 48: 770–781.
50. Stienstra R, Saudale F, Duval C, et al. Kupffer cells promote hepatic steatosis via interleukin-1beta-dependent suppression of peroxisome proliferator-activated receptor alpha activity. Hepatology 2010; 51: 511–522.

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

Data S1: Supplemental materials and methods.

Table S1: List of TaqMan gene expression assay probes used in RT-PCR.

Table S2: Lipoprotein signaling-specific PCR array analysis of transplanted rats' liver. Data are shown as gene expression fold-change of ZD-BM/ZC versus ZC-BM/ZC rats.

Figure S1: Correlations between macrophage markers and lipid metabolism–related gene expression. *Cd68* and *Cd163* were found to be positively correlated with *Cd36,* Fatty acid binding protein 4 *(Fabp4)*, and Lipoprotein lipase *(Lpl)* mRNA expression in liver.

SUPPLEMENTAL MATERIAL AND METHODS

Blood glucose and glycated hemoglobin A1c (HbA1c) determination

For glucose level determination, animals were fasted for 4h after which a blood sample was extracted through the lateral tail vein and analyzed with a Glucocard™ Memory 2 meter (A. Menarini Diagnostics). HbA1c was determined from sodium citrate-anticoagulated blood using the GLYCO-Tek Affinity Column Kit (Helena Laboratories).

Body mass index and abdominal fat index ratio determination

Photographs of all animals were taken on the day of sacrifice and length (distance from nose to anus) and waist width for each animal were determined using NIH Image J software (public domain software, National Institutes of Health, version 1.62) by a blinded observer. BMI was calculated by BMI=Weight(kg)/Length(m)^2 and the abdominal fat index (AFI) was calculated by AFI=Waist(cm)/Length(cm).

Bone marrow transplants

A) Recipient conditioning. Animals received combined immunosuppressive therapy consistent of 60mg/kg of cyclophosphamide (i.p.; Genoxal® Baxter Oncology GmbH) 2 days prior to transplantation (day -2) and 20mg/kg of busulfan (Allen Farmaceútica S.A.) on day -1 administered orally through a gastric gavage diluted in 1ml saline.

B) Bone marrow extraction. Animals were anesthetized with a combination of ketamine and medetomidine (75mg/kg and 0.5mg/kg; i.p.) and then sacrificed with an overdose of sodium pentobarbital (i.c.). Femurs and tibias from both hind legs were isolated and bone marrow was flushed with Dulbecco's Modified Eagle Media (DMEM; Gibco) and filtered through a 100µm mesh to eliminate remaining bone fragments.

C) Bone marrow transplantation. On day 0, previously immunosuppressed recipients were anesthetized with ketamine-medetomidine (i.p.) and buprenorphine was administered as an analgesic. Bone marrow was extracted from the donors as previously described. $3x10^7$ fresh bone marrow nucleated cells suspended in DMEM ($6x10^7$cells/ml) were injected through the lateral tail vein followed by 0.5ml of saline. Transplanted animals received antibiotic treatment for 5 days following transplantation (enrofloxacine; 20mg/kg every 24h; s.c.). Blood cell counts were performed on days -2, 0, 7, 14, 21, and 28 to

assess the effect of the immunosuppressive treatment as well as post-transplantation recovery.

FIGURE S1

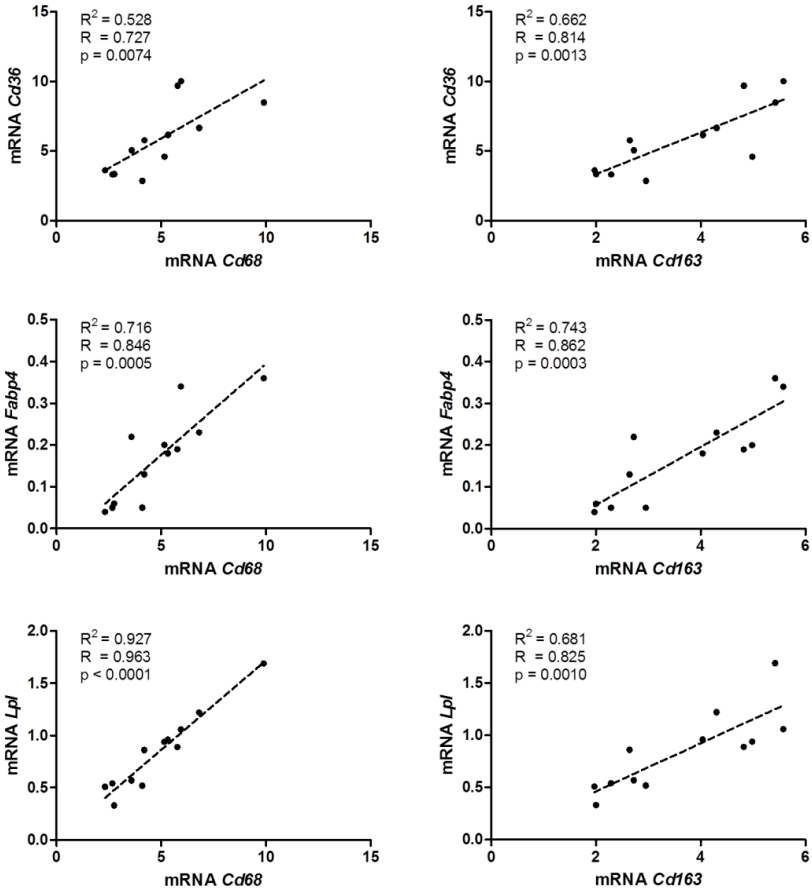


Figure S1. Correlations between macrophage markers and lipid metabolism-related gene expression. *Cd68* and *Cd163* were found positively correlated to *Cd36*, Fatty acid binding protein 4 (*Fabp4)* and Lipoprotein lipase (*Lpl)* mRNA expression in liver.

Table S1. List of Taqman gene expression assay probes used in RT-PCR.

Gene symbol	TaqMan gene expression assays reference
Cd14	*Rn00572656_g1*
Cd36	*Rn01442640_g1*
Cd68	*Rn01495634_g1*
Cd163	*Rn01492522_g1*
Fabp4	*Rn00670361_m1*
Il1b	*Rn00580432_m1*
Lpl	*Rn00561482_m1*
Nlrp3	*Rn04244625_m1*
Pparg	*Rn00440945_m1*
Ppia	*Rn00690933_m1*
Tnfa	*Rn9999917_m1*

Table S2. Lipoprotein signaling specific PCR Array analysis of transplanted rats' liver. Data are shown as gene expression fold-change of ZD-BM/ZC vs ZC-BM/ZC rats.

ZD-BM/ZC vs ZC-BM/ZC					
Gene	**Fold-Change**	**p-value**	**Gene**	**Fold-Change**	**p-value**
Abca1	1,08	0,7017	Insig2	1,24	0,3480
Abca2	**-1,78**	**0,0187**	Lcat	1,03	0,8597
Abcg1	1,33	0,3726	Ldlr	-1,21	0,3986
Acaa2	-1,08	0,3555	Ldlrap1	-1,33	0,0690
Akr1d1	1,00	0,9901	Lep	-1,07	0,9462
Angptl3	-1,09	0,5366	Lipe	1,01	0,9404
Ankra2	1,11	0,5195	**Lrp10**	**-1,39**	**0,0397**
Apoa1	1,02	0,8436	Lrp12	-1,19	0,2065
Apoa2	1,18	0,4216	Lrp1b	1,64	0,2013
Apoa4	-1,12	0,2521	**Lrp6**	**1,25**	**0,0097**
Apob	1,18	0,2710	Lrpap1	1,08	0,6297
Apoc1	1,09	0,5421	Mbtps1	-1,20	0,2131
Apoc3	1,03	0,7687	Mvd	-1,16	0,6561
Apod	1,51	0,3041	Mvk	1,05	0,8356
Apoe	-1,06	0,6515	Nr0b2	-1,22	0,7206
Apof	-1,23	0,3307	Nr1h2	-1,07	0,4413
Apol2	1,43	0,2395	Nr1h3	-1,23	0,2707
Cdh13	**-1,92**	**0,0400**	**Nr1h4**	**1,27**	**0,0228**
Cel	1,13	0,2829	Nsdhl	-1,01	0,9611
Cela3b	**1,65**	**0,0010**	Olr1	1,86	0,2698
Cnbp	-1,01	0,9105	Osbpl1a	1,08	0,5688
Colec12	**1,61**	**0,0293**	Osbpl5	1,26	0,2814
Cxcl16	-1,02	0,9548	Pcsk9	1,12	0,7824
Cyb5r3	-1,08	0,6673	Pmvk	1,12	0,2918
Cyp11a1	1,32	0,6117	Prkaa1	-1,06	0,6094
Cyp39a1	-1,05	0,8140	Prkaa2	1,16	0,3325
Cyp46a1	-1,93	0,3111	Prkag2	-1,10	0,5719
Cyp51	1,11	0,6926	RGD1564999	-1,01	0,9931
Cyp7a1	-1,01	0,9785	Scap	1,11	0,4903
Cyp7b1	1,30	0,1204	Scarf1	-1,06	0,7812
Dhcr24	**-2,27**	**0,0438**	**Snx17**	**-1,48**	**0,0158**
Dhcr7	-1,17	0,4785	Soat1	1,24	0,2346
Ebp	1,04	0,8185	Soat2	-1,20	0,2314
Fdft1	1,14	0,5478	Sorl1	1,04	0,7087
Fdps	1,11	0,7333	**Srebf1**	**-2,29**	**0,0348**
Hdlbp	-1,10	0,4273	Srebf2	-1,03	0,8831
Hmgcr	1,13	0,4498	Stab2	-1,15	0,1245
Hmgcs1	1,17	0,4639	Stard3	-1,26	0,0694
Hmgcs2	-1,10	0,4469	Tm7sf2	1,05	0,8519
Idi1	1,03	0,8761	Trerf1	-1,32	0,6198
Il4	1,60	0,1498	Vldlr	1,30	0,0625
Insig1	1,49	0,1958	**Zmynd15**	**3,51**	**0,0088**

ARTÍCULO 5

"Cardiovascular risk factors regulate the cross-talk of coronary perivascular adipose-derived stem cells with vascular cells"

Maria Teresa Bejar[1], Esther Peña[1], Oriol Juan-Babot[1], Javier Crespo[1], Gemma Arderiu, Lina Badimon[1,2]

[1]Cardiovascular Research Center, CSIC-ICCC , Hospital de la Santa Creu i Sant Pau (UAB), Barcelona, Spain.

[2]Cardiovascular Research Chair, UAB, Barcelona, Spain.

En revisión en: Journal of the American College of Cardiology. Manuscrito #JACC100316-3944

Factor de impacto (2015): 17.759

RESUMEN

Los factores de riesgo cardiovascular regulan la interacción de las células madre derivadas de tejido adiposo perivascular coronario con las células vasculares

El tejido adiposo perivascular está íntimamente asociado a los factores de riesgo cardiovascular, así como a la presencia de enfermedad de las arterias coronarias. A pesar de que se acepta la implicación de las células madre vasculares/perivasculares en el desarrollo de la placa aterosclerótica, no se ha estudiado el posible papel de las células madre derivadas de tejido adiposo (ASC) perivascular coronario en este proceso.

El objetivo de este estudio es caracterizar las ASC del tejido adiposo perivascular coronario e investigar su interacción directa e indirecta con las células musculares lisas (VSMC), las cuales juegan un importante papel en el desarrollo de la aterosclerosis.

Las ASC se obtuvieron de la arteria coronaria lateral anterior descendente de pacientes sometidos a trasplante de corazón, y se caracterizaron mediante

citometría de flujo, ensayos de proliferación, diferenciación y angiogénesis *in vitro*. Los co-cultivos y el medio condicionado de las ASC se utilizaron para analizar las interacciones entre ASC y VSMC.

Se detectaron marcadores típicos de ASC en la adventicia de las arterias coronarias, así como en la fracción vascular del estroma del tejido adiposo perivascular coronario. Las ASC mostraron tener un alto potencial angiogénico en los ensayos de formación de tubos en matrigel en co-cultivo con VSMC. Además, las ASC de pacientes con una elevada carga de factores de riesgo mostraron una mayor expresión de *Tissue factor* (TF), así como una mayor migración en co-cultivo hacia las VSMC y un mayor efecto proliferativo sobre estas últimas. El silenciamiento de la expresión de TF en las ASC dio lugar a una disrupción de las interacciones angiogénicas en matrigel con las VSMC.

Nuestros resultados sugieren un nuevo mecanismo por el cual el tejido adiposo perivascular podría participar en la regulación vascular. Las ASC de tejido adiposo perivascular coronario podrían dirigir los procesos angiogénicos y proliferativos de las VSMC, por una señalización mediada en parte por la expresión de TF.

Cardiovascular risk factors regulate the cross-talk of coronary perivascular adipose-derived stem cells with vascular cells

Maria Teresa Bejar[1], Esther Peña[1], Oriol Juan-Babot[1], Javier Crespo[1], Gemma Arderiu[1] and Lina Badimon[1,2]

[1]Cardiovascular Research Center, CSIC-ICCC, IIB-Sant Pau, Barcelona, Spain

[2]Cardiovascular Research Chair, UAB, Barcelona, Spain

Corresponding author:

Prof. Lina Badimon

Cardiovascular Research Center,
C/Sant Antoni Maria Claret 167,
08025 Barcelona, Spain.
Tel.: +34 93 556 59 00
Fax: +34 93 556 55 59
e-mail address: lbadimon@csic-iccc.org

Sources of funding:

This work was supported by the Spanish Cardiovascular Network of Cell Therapy (RedTerCel) from the Instituto Salud Carlos III (to L.B.). Additional funding was received from Plan Nacional de Salud (PNS) [2013-42962-R to L.B. and 2015-71653-R to GV] from the Spanish Ministry of Science and Innovation and FEDER funds. M.T.B. holds a predoctoral fellowship from the Catalan Government (FIDGR2013). We thank Fundacion Jesus Serra, Barcelona for continuous support.

ABSTRACT

Background. The amount of perivascular adipose tissue (PVAT) has been associated to the burden of cardiovascular risk factors and the presence of coronary artery disease. Although the "outside to inside" regulation hypothesis of perivascular fat is currently accepted, the role of the coronary PVAT derived stem cells (ASC) niche is not known.

Objectives. The aim of this study is to characterize ASCs from coronary PVAT and investigate direct and indirect interactions with vascular smooth muscle cells (VSMC), which play a principal role in atherosclerosis development.

Methods. ASC were obtained from PVAT of lateral descending anterior (LAD) coronary arteries of patients undergoing heart transplantation and characterized in vitro by flow cytometry, proliferation, differentiation and angiogenesis assays. Co-cultures and ASC-conditioned medium were used to analyze the effect of ASC on VSMCs.

Results. ASCs expressing typical mesenchymal stem cell markers were detected in the adventitia of LAD coronary arteries and in the stromal vascular fraction of LAD PVAT. High angiogenic potential of cultured ASCs was shown in vitro by matrigel-based tube formation assay in co-culture with VSMC. Moreover, ASCs from patients with high clustering of cardiovascular risk factors and predominance of dyslipidemia showed an increased expression of F3 gene and tissue factor protein, and a higher migration in co-culture with VSMC, as well as a higher induction of VSMC proliferation. F3 gene silencing in ASCs led to a disruption of angiogenic interaction with VSMC in matrigel.

Conclusions. Our results indicate for the first time a novel mechanism of regulation of vascular function by perivascular fat. Coronary PVAT-ASCs drive the angiogenic and proliferative processes in coronary artery VSMC, by a mechanism in part mediated by F3 expression and tissue factor production.

Keywords: perivascular fat, coronary arteries, adipose-derived stem cells, tissue factor, vascular smooth muscle cells

ABBREVIATIONS

ASC: adipose-derived stem cells; CVRF: cardiovascular risk factors; DLP: dyslipidemia; LAD: left anterior descending; MSC: mesenchymal stem cells; PDT: population doubling time; PVAT: perivascular adipose tissue; SVF: stromal vascular fraction; TF: tissue factor; VSMC: vascular smooth muscle cells

INTRODUCTION

Perivascular adipose tissue (PVAT) is increasingly being investigated as a key partaker in vascular function. PVAT directly surrounds most of human arteries, including coronary arteries, and recent studies are providing insights to the role PVAT may play in cardiovascular disease risk (1–3). Coronary perivascular fat volume has been closely associated with atherosclerotic plaque burden (4) and it has been shown that segments of coronary arteries lacking perivascular adipose tissue or separated from it by a bridge of myocardium are protected against the development of atherosclerosis (5, 6). However, both protective physiologic and pathologic properties of PVAT have been proposed, and the precise mechanisms underlying the effects of PVAT on cardiovascular disease development are not fully understood.

Adipose tissue is a source of adipose-derived stem cells (ASC), which in response to specific signaling from their niche can stimulate angiogenesis, promoting progenitor cell differentiation and paracrine pro-angiogenic and immunomodulatory effects (7). Recent studies have described a co-localization of ASC and the arterial adventitia in adipose tissue (8), thus suggesting a close interaction between ASC and the vasculature-related cells.

Inflammation and neogenesis of vasa vasorum in the adventitia contribute to neovascularization of both media and intimal plaques (9, 10), and it is known that unstructured neoangiogenesis and its associated intraplaque hemorrhages increases the vulnerability of atherosclerotic plaques (11, 12). Moreover, increasing evidence has shown that abnormal proliferation and migration of vascular smooth muscle cells (VSMCs) are the main cause of intimal thickening (13, 14).

In this study we hypothesized that the PVAT-ASC niche participates in cardiovascular disease development by regulating the angiogenic processes in the enclosed underneath coronary artery through ASC-paracrine effects over vascular lineage cells. Thus, the aim of this study is to isolate and characterize the angiogenic properties of resident ASC in human coronary PVAT, and investigate direct and indirect interactions with VSMC, to shed light on the role of ASC in atherosclerotic coronary artery disease development.

METHODS

Sample collection/ Patients

Coronary perivascular adipose tissue was obtained from 15 patients undergoing cardiac transplantation at the Hospital de Sant Pau i la Santa Creu. Tissue was obtained with informed consent of patients. The protocol was approved by the Research Ethics Committee at the study center and was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki. Patients used regular medication as recommended in the guidelines. Left anterior descending (LAD) coronary arteries were collected, and after PVAT isolation, fixed in 4% paraformaldehyde and stored at -80ºC embedded in OCT until histological analysis. Coronary perivascular adipose tissue was carefully dissected, placed in tubes with 5ml of Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Gibco, Life Technologies, Grand Island, NY, USA) supplemented with 1% penicillin/streptomycin (Gibco, Life Technologies, Grand Island, NY, USA) and processed immediately. A simplified scheme of the procedure is shown in Figure 1.

Immunohistochemical analsysis

Coronary artery samples were characterized by staining with Masson's trichromic or hematoxylin-eosin in order to classify atherosclerotic lesions into Early or Advanced atherosclerosis according to the criteria of the American Heart Association (AHA) (15). Additionally, the samples were processed for immunohistochemistry. Sections (5 µm thick) were immunostained with conjugated antibodies CD44-PE, CD45-PE-Cy5, CD90-FITC (BD Biosciences), α-smooth muscle actin (SMA)-FITC (Abcam), or primary antibody TF (Sekisui diagnostics) with secondary antibody Alexa Fluor anti-mouse 633 IgG. Images were recorded on a Leica inverted fluorescence confocal microscope.

ASC isolation and culture

Coronary PVAT was washed with sterile phosphate buffered saline (PBS) supplemented with 100 U/ml of penicillin and 100 µg/ml of streptomycin. Once the weight was determined, the tissue was minced into a type I collagenase solution (1 mg/ml; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and was incubated for 1 hour in a 37ºC pre-warmed orbital shaker. Collagenase activity was neutralized with equal volume of DMEM supplemented with 10% FBS (Biological Industries,

Kibbutz Beit-Haemek, Israel) and 1% penicillin/streptomycin and the suspension was centrifuged at 1200 rpm for 10 min to obtain SVF. The pellet was resuspended in the medium described above and filtered through a 100µm mesh filter to eliminate remaining tissue fragments. Isolated SVF cells were counted and either analyzed or plated onto a 25-cm^2 culture flasks. After twenty-four hours non-adherent cells were removed and the medium replaced. Cells were expanded in a humidified environment at 37ºC with 1% O_2, 5% CO_2 and maintained at subconfluent levels prior to phenotypic profile analysis. The identity of ASCs was defined by using the following criteria: adherence to plastic, cell surface antigen phenotyping and differentiation into multiple cell lineages. All analyses were performed between passages 3 to 5.

Flow cytometry

Surface specific mesenchymal stem cell (MSC) markers were analyzed by flow cytometry in SVF and ASCs at passage 3. Cells were suspended in flow cytometry buffer (FCB) (PBS, 0.1% BSA, 0.1% sodium azide). Cell aliquots (1 x 105 cells) were incubated for 30 min at 4ºC with monoclonal labeled antibodies against, CD29-PE, CD44-PE, CD45-PE-Cy5, CD73-FITC, CD90-FITC, CD105-PE (BD Biosciences, Belgium), CD14-FITC and CD34-PC5 (Beckman Coulter, France). Isotype-identical antibodies (BD Biosciences) were used as controls. A total of 10,000 events were analyzed by fluorescence-activated cell sorting (FACS) using a Beckman Coulter Epics XL instrument and Expo 32 ADC XL 4 color software.

ASCs differentiation potential

Adipogenic differentiation: ASCs were seeded at a density of 1.5 x 10^4 cells/cm^2 in 6-well plates and allowed to grow to confluence. Subsequently, cells were allowed to differentiate for 21 days in the adipogenic medium containing 0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine, 1 µM dexamethasone, 100 µM indomethacin and 10 µg/ml insulin. All chemicals were obtained from Sigma-Aldrich. Differentiation was evaluated by Oil Red O staining and lineage specific gene expression pattern (ADIPOQ, FABP4, LPL and PPARG) by real-time PCR.

Osteogenic differentiation: ASCs were seeded at a density of 1.5 x 10^4 cells/cm^2 in 6-well plates and induced with osteogenic medium containing 2 mM β-glycerophosphate disodium, 10-7 M dexamethasone, 50 µg/ml ascorbic acid and 0.15 mM sodium phosphate for 21 days. All chemicals were obtained from

Sigma-Aldrich. Differentiation was evaluated by Alizarin red staining and lineage specific gene expression by real-time PCR (ALP, BMP2, SPP1 and RUNX2).

Growth kinetics of ASCs

To determine the growth kinetics of ASCs, 2 x 104 cells were seeded in 6-well plates. Cells from 2 duplicate wells were harvested and counted every other day. ASC numbers were plotted against the number of days cultured. The exponential-growth phase was determined, and population doubling time (PDT) was calculated using the formula PDT= Te/[(log N2 - log N1)/log2], where Te is time (d) in the exponential-growth phase, N1 is the number of cells at the beginning of the exponential-growth phase, and N2 is the number of cells at the end of the exponential-growth phase.

Angiotube formation assay

Matrigel-based angiotube formation assay was employed to assess the angiogenic potential of ASCs. Briefly, 1x105 cells were seeded in a matrigel-coated plate and incubated in endothelial cell growth medium (EGM-2 BulletKit, Lonza, USA) for 24h to allow the formation of angiotubes. In the co-culture assay, VSMC were mixed in a 1:1 ratio with ASC prior to seeding in matrigel. Tube length and tube-covered area from three fields per well (X40 magnification) were quantified using ImageJ 1.50a software (National Institutes of Health, USA).

In vivo cell labeling co-culture assays

ASC and VSMC co-cultures (1:1) in matrigel tube formation assay were labeled to discriminate each cell type with two different living cell fluorescent membrane dyes, PKH26 and PKH67 Linker for red/green cell labeling and Cell Linker Kit (Sigma-Aldrich), following manufacturer's indications. Images were acquired on a Leica inverted fluorescence confocal microscope (Leica TCS SP2-AOBS, Germany).

Wound healing assay

Wound healing assays were performed in Ibidi's Culture-Insert petri dish (Ibidi, Martinsried, Germany). Confluent monolayers of VSMC were seeded on one

side of the insert and ASC on the other side. Cell migration into the wound surface was monitored every two hours for 10h. Wounds areas were analyzed by using Image J software.

ASC conditioned medium collection

ASC at passage 3 were allowed to growth until reaching sub-confluence, then cells were washed exhaustively with PBS to remove FBS and serum-free medium was added. After 24h, the ASC conditioned medium was collected and centrifuged at 1200 rpm for 10 min to remove cellular debris and kept at -80ºC until used.

Effect of ASC conditioned medium on VSMC proliferation

The effect of the ASC secretome on VSMC proliferation was determined by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfopheny)-2H-tetrazolium (MTS) assay (CellTiter 96 Aqueous One Solution cell proliferation assay kit; Promega, Madison, WI, USA). 5x103cells were seeded in triplicates in a 96-well plate in growth medium and allowed to attach overnight. Growth media was removed, cells were washed twice with PBS and ASC conditioned medium was added. 24 hours later, 10µl of MTS per well were added, incubated for two hours and then the absorbance was quantified.

CCL2 and TF activity determination

The presence of CCL2, end-product of TF signaling in vascular cells, and active TF in the ASC conditioned medium was determined by human MCP-1 enzyme linked immunosorbent assay (Abcam) and ACTICHROME® TF activity assay (Seikisui diagnostics) respectively, according to the manufacturer's instructions.

Gene expression analysis

Total RNA was isolated from ASCs using RNeasy mini isolation kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) according to the manufacturer’s instructions. Isolated total RNA was reverse-transcribed into cDNA using High Capacity cDNA Archive kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). mRNA levels were analyzed by real-time PCR using TaqMan gene expression assays (Applied Biosystems) and the Applied Biosystems Prism 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems) according to manufacturer’s instructions. Gene expression data are

expressed as target gene mRNA expression relative to housekeeping gene expression (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; GAPDH). TaqMan gene expression assays are provided in tableS1.

Silencing RNA

The insertion of small interfering RNAs (siRNAs) into ASCs was done with a Nucleofector device and the Human Mesenchymal Stem Cell (MSC) Nucleofector® Kit (Amaxa, Inc.). The transfection protocol was performed following the manufacturer's instructions using the U23 program. The siRNAs against TF (s4932), was purchased from Applied Biosystems. In all experiments, a scrambled siRNA (Silencer Negative control siRNA from Applied Biosystems #AM4638) was used as control to evidence any unspecific changes in cell phenotype that may result from the use of siRNA.

Statistical Analyses

Values are expressed as mean ± SEM. Shapiro-Wilk test was applied to verify the normal distribution of the data and statistical analysis were accordingly applied. For independent factors (comparisons between groups) Mann-Whitney and Kruskal-Wallis tests were used to analyze non-parametric data. All statistical calculations were performed using GraphPad software (La Jolla, LA, USA). Values were considered to be significantly different when $P<0.05$.

RESULTS

Characterization of human coronary PVAT stromal vascular fraction (SVF)

Fresh isolated SVF cells analyzed by flow cytometry showed the presence of surface mesenchymal stem cell markers CD29, CD34, CD44 (>10% of positive cells) and CD90 (>5% of positive cells). Triple staining for CD29+CD90+CD45- cells, corresponding to potential ASCs, represented around 1% of the SVF population. Monocyte/macrophage as well as CD45+ (hematopoietic) cells were more abundant than ASC in the SVF (Figure 2 and Figure S1).

Characterization of isolated ASC from coronary PVAT

ASCs were isolated as described from coronary PVAT and characterized by cell surface markers analysis and the evaluation of their multilineage differentiation

capacity. At passage 3, ASCs expressed the mesenchymal stem cell surface markers CD29, CD44, CD73, CD90 and CD105, and were negative for the hematopoietic marker CD45 (Figure 3).

ASCs were induced to differentiate by specific adipogenic and osteogenic culture conditions. During the differentiation processes, changes in ASC morphology were observed. Differentiation of ASCs into adipocytes was evidenced by intracellular lipid droplets and the analysis of adipocyte markers. Adipocyte-specific genes Fatty acid binding protein 4 (FABP4), Lipoprotein lipase (LPL), Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARγ) and adiponectin (ADIPOQ), which were nearly undetectable in undifferentiated ASCs, were significantly increased after adipogenic induction (Figure 4). After osteogenic induction, a highly calcified extracellular matrix was observed after Alizarin red staining. Moreover, alkaline phosphatase (ALP), bone morphogenetic protein 2 (BMP2) and Runt-related transcription factor 2 (RUNX2) were up-regulated in differentiated cells (Figure 4).

Therefore ASCs present in atherosclerotic coronary artery PVAT are functional and multipotent.

Angiogenic potential in vitro of ASCs

ASCs at passage 3 expressed the angiogenesis-related genes PECAM1, VEGFR1, VEGFR2 and VWF. Interestingly, high levels of F3 mRNA (gene encoding for TF protein) expression were found in these cells (Figure 5A). A matrigel-based tube formation assay was performed to analyze the functional angiogenic capacity of coronary perivascular ASCs in a three-dimensional matrix in vitro. Results showed that ASCs were able to form tubular networks in matrigel (Figure 5B).

To assess whether ASC and VSMC were able to interact, a matrigel-based tube formation was performed (3D co-cultures). The co-culture showed that ASCs and VSMCs were able to form tubular networks with a close interaction between both cell types, in presence of endothelial growth medium (Figure 5C). Moreover, serum-free ASC-conditioned medium (secretome of cultured ASCs) significantly increased the proliferation of VSMCs compared to control medium (Figure 5D).

Impact of CVRF on ASC-VSMC cross-talk

Interestingly, TF mRNA expression was 2-fold increased in ASC obtained from patients with high cardiovascular risk factors clustering and dyslipidemia (CVRF/DLP+) compared to those with low CVRF burden (CVRF/DLP-). Vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2) mRNA levels were reduced in ASCs from CVRF/DLP+ patients, while no differences were found in other less expressed angiogenesis-related genes (Figure 6A). Despite of the differences observed in gene expression, ASCs from both groups were able to form tubular structures in a matrigel-based assay (Figure 6B) and no differences were found in TF activity nor CCL2 protein levels measured in serum-free ASC-conditioned medium (Figure 6C). Because dyslipidemic patients are always treated with statins, we tested whether effects due to statins could modulate expression of TF or ASC proliferation in vitro. As shown in Figure S3, treating with atorvastatin slightly reduced TF expression, while no effects on proliferation were observed.

A wound repair test was performed opposing ASCs and VSMCs and the wound-recovered area was measured. ASCs showed higher motility than VSMCs (Figure 7A) as more ASCs moved over the wound. ASCs from CVRF/DLP+ patients had increased migratory activity over that of ASC from CVRF/DLP- patients, reaching significance at 8 hours of migration (Figure 7B).

Tissue factor protein expression was investigated by confocal microcopy. ASCs showed higher expression levels of TF than VSMCs and those ASC from CVRF/DLP+ patients had higher TF levels in the migratory front (Figure 7C).

In order to assess whether CVRF clustering could induce changes in the ASC secretome, VSMC proliferation was measured after 24h treatment with serum-free ASC-conditioned medium. As shown in Figure 7D, the ability to induce VSMC proliferation was higher in ASC from CVRF/DLP+ patients compared to CVRF/DLP-.

Moreover, ASCs from CVRF/DLP+ showed higher proliferation rate compared to those from CVRF/DLP- patients (PDT: 2 ± 0.3 days vs 3.2 ± 0.3 days respectively; Figure S2).

In summary, ASCs from patients with high cardiovascular risk factors (CVRF) clustering with a predominance of dyslipidemia (CVRF/DLP+) showed higher expression of TF and an increased migration in co-culture with VSMC.

Tissue factor silencing in ASCs disrupts the angiogenic interaction with VSMC

In order to ascertain whether the expression of tissue factor in ASCs could affect the ASC-VSMC interaction, F3 gene was silenced in ASCs by siRNA prior to the co-culture in a matrigel tube formation assay. F3-silencing achieved a reduction of a 96.4% in TF expression compared to ASC transfected with a negative control siRNA. Abrogation of TF expression in ASCs reduced their ability to migrate towards VSMCs and form complex tubular networks. As shown in Z-sections of Figure 8 (lateral right of confocal images), F3-silenced ASC were not able to merge with VSMC (colored in yellow) to form tubular structures.

ASC are found in the boundary of adventitia-PVAT of the studied coronary arteries

The studied LAD coronary arteries showed different stages of atherosclerotic lesion development, that were classified as moderated (from adaptative intimal thickening to type III) and advanced (from type IV to VIII) lesions (Table 1). Histological analysis of coronary arteries with advanced atherosclerotic lesions evidenced the presence of well developed microvessels in the boundary of the coronary artery adventitia and the perivascular adipose tissue (PVAT), as shown by α-SMA staining (Figure 9). Because our previous studies had shown the relationship between inner atherosclerotic plaque angiogenesis and Tissue factor (TF)(16), we analyzed TF protein expression and ASC markers in the boundary layer. TF was detected in microvessel-rich areas (Figure 9B). Interestingly, serial sections showed co-localization of microvessels and CD44+CD90+CD45- ASCs (Figure 9C,D).

DISCUSSION

Perivascular adipose tissue can be found directly around the adventitia of most arteries, including coronary arteries, without any laminar structure or barrier to separate them. It has been described that PVAT releases a wide range of biologically active molecules which acts as paracrine modulators of vascular

function, affecting vascular tone and infiltration of inflammatory cells (17, 18). Coronary PVAT volume has been closely associated with atherosclerotic plaque burden (4), however, while recent studies are focusing on the contribution of PVAT to adventitial inflammation, little attention has been paid on resident ASC and their contribution to atherosclerotic development. In this study, we described coronary perivascular ASC angiogenic and paracrine properties that suggest an active contribution of these cells to vessel wall function and structure.

In agreement to previous reports (8), ASC markers were detected in the tunica adventitia of human coronary arteries. Interestingly, serial sections of coronary arteries with advanced atherosclerotic lesion showed co-localization of ASC markers and vasa vasorum in the adventitia. The presence of resident ASCs in coronary PVAT was assessed by flow cytometry analysis of the SVF, which consists in the heterogeneous cellular mixture obtained from PVAT enzymatic digestion and adipocyte removal. Triple staining allowed the detection of non-hematopoietic stem cells (CD45-) expressing characteristic MSC markers, and our results showed that ASCs represent an average of 1% of total SVF cells in LAD coronary PVAT. After three passages, an homogeneous population of ASC was obtained, fulfilling the criteria stated by the International Society for Cellular Therapy to define MSC (19). Multilineage differentiation potential in vitro of coronary perivascular ASCs was shown by high expression of terminal differentiation markers of both adipocytes and osteoblasts, in addition to morphological changes as intracellular lipid droplet formation or extracellular calcium secretion respectively.

Pro-angiogenic properties of ASCs are of great interest in terms of regenerative medicine, since several studies have shown that ASCs express and release important angiogenic growth factors and cytokines and that their conditioned medium promotes angiogenesis in vitro and in vivo (20, 21). Although vessel-promoting capability of ASCs is mainly attributed to their paracrine effects, some authors have reported that ASCs are able to differentiate into endothelial cells (22) or integrate into vascular components and potentially stabilize their structure during network development (23). Given the location of ASCs within the adventitia in the analyzed coronary arteries and their angiogenesis-related features, a contribution to the modulation of vasa vasorum neogenesis and therefore participation in atherosclerosis development should be considered.

Hence, we analyzed the angiogenic capacity of coronary perivascular ASCs. Undifferentiated ASCs at passage 3, expanded under 1% oxygen atmosphere, expressed the endothelial marker genes PECAM1, VEGFR1, VEGFR2 and VWF. VEGFR2, which regulates several cellular activities involved in angiogenesis, including endothelial cell migration, survival and tube formation, was the most expressed transcript. Indeed, ASCs formed a network of tubular structures when seeded in matrigel in the presence of angiogenic growth factors, suggesting angiogenic competence.

Growth (proliferation and/or hypertrophy) and migration of VSMC play a major role in proliferative vascular diseases such as atherosclerosis. The phenotypic switching of VSMC, which induces an aberrant proliferation that promotes plaque formation, is stimulated by the local microenvironment, including released growth factors and cytokines (24). While it has been shown that PVAT surrounding arteries may signal from the outside in, the vasculature should have a similar capacity to directly communicate with the adventitia and PVAT. This concept supports the hypothesis that VSMCs have the potential to crosstalk with surrounding PVAT and therefore resident ASCs. In order to elucidate whether ASCs may interact with VSMC, a 3D co-culture was performed in presence of endothelial growth factors. As a result, in a few hours the two cell populations established close interactions and became organized by building a tubular network. However, not only the direct crosstalk between both cell populations was noticeable, because the secretome released by ASCs induced VSMC proliferation. These findings suggest for the first time that ASC may interact with VSMCs in a pro-angiogenic manner in the arterial outer layers.

TF has been shown to participate in a variety of physiological processes distinct from coagulation, including cellular signaling, cell migration, and angiogenesis (25–27). Accordingly to previously reported data (28), TF protein expression was detected in the adventitia of coronary arteries, near to microvessels. TF mRNA expression was then analyzed in ASC and a strikingly high level of expression was found, suggesting an important biological function for TF on these cells. Up-regulation of F3 as well as elevated TF activity in microvessels have been found in circulating monocytes and plasma, respectively, from hyperlipidemic patients (29, 30). On the other hand, dyslipidemia together with other CVRF have shown to affect ASC phenotype and angiogenic function (31–

33). Based on the foregoing, we aimed to assess whether a higher expression of F3 in ASCs was related to the presence of dyslipidemia and CVRF clustering.

Due to high variability in clinical features, patients were divided in two groups depending on their low or high accumulation of CVRF. High CVRF burden was highly associated to the presence of dyslipidemia, consequently the groups were named CVRF/DLP- for patients with lower risk factors burden and absence of dyslipidemia and CVRF/DLP+ for dyslipidemic patients together with higher CVRF clustering. Comparison between groups showed a 2-fold up-regulation of F3 gene expression in ASCs from CVRF/DLP+ patients. Tubular structure formation capacity in 3D culture was not altered in the ASC from these patients, however, VEGFR2 expression was significantly decreased and proliferation rate was higher in comparison to CVRF/DLP- group. Although the impact of this differences on the angiogenic properties of ASCs is difficult to observe in relatively short time assays, a higher TF signaling together with lower expression of genes orchestrating tube formation as VEGFR2 and an active proliferative state may result in a prompt but unstable vascular formation in vivo(34–36). In addition, wound healing assay demonstrated a significantly higher migration of ASCs from CVRF/DLP+ patients towards VSMCs simultaneously to a higher expression of TF protein detected by confocal microscopy. Even though CVRF/DLP+ ASCs showed lower population doubling time than CVRF/DLP- ASCs, proliferation is not involved in short time migration assays. Moreover, a higher paracrine crosstalk between ASCs from CVRF/DLP+ patients and VSMCs is indicated by an increased proliferation of VSMC treated with CVRF/DLP+ ASC secretome compared to CVRF/DLP- ASCs. The above described pro-angiogenic and proliferative effects of coronary perivascular ASCs on VSMCs deserve further investigation, since it is known that increased coronary vasa vasorum neovascularization precede coronary endothelial dysfunction in presence of hypercholesterolemia (37) and intraplaque hemorrhages due to unstructured neoangiogenesis increases plaque vulnerability (11, 12). It is noteworthy to remark that patients corresponding to the CVRF/DLP+ group presented more advanced atherosclerotic lesions, however, whether their ASC phenotype is cause or consequence from it, should be addressed in the future. Previous results from our group have shown that TF signals may regulate coronary VSMC migration and vascular remodeling (38). Thus, we silenced TF expression in ASCs in order to elucidate the role of TF in ASC-VSMC angiogenic crosstalk. A tube formation assay in a 3D co-culture

showed that TF silenced ASCs were not able to form tubular structures nor closely interact to VSMCs, confirming a principal role of TF in these processes.

As a limitation to our study we should mention the low number of samples. However heart transplant operations are rare and not many hearts could be use in this research where both PVF and the underneath coronary artery are analyzed. A second limitation resides in the characteristics of the patients waiting for heart transplant as they are not in the acute phase and they are treated as per guidelines with pharmacological agents. Both groups were receiving similar treatments except for statins in the dyslipidemic group. Studies were performed and showed as supplementary material on the tentative effects of atorvastatin.

In summary, we report for the first time a novel angiogenic crosstalk between human coronary perivascular ASCs and VSMCs driven in part by TF expression that is increased in patients with accumulation of CVRF with predominance of dyslipidemia and with advanced atherosclerotic lesions.

REFERENCES

1. Rosito GA, Massaro JM, Hoffmann U, et al. Pericardial fat, visceral abdominal fat, cardiovascular disease risk factors, and vascular calcification in a community-based sample: the Framingham Heart Study. Circulation 2008;117:605–13.

2. Taguchi R, Takasu J, Itani Y, et al. Pericardial fat accumulation in men as a risk factor for coronary artery disease. Atherosclerosis 2001;157:203–209.

3. Greif M, Becker A, von Ziegler F, et al. Pericardial adipose tissue determined by dual source CT is a risk factor for coronary atherosclerosis. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 2009;29:781–6.

4. Mahabadi AA, Reinsch N, Lehmann N, et al. Association of pericoronary fat volume with atherosclerotic plaque burden in the underlying coronary artery: A segment analysis. Atherosclerosis 2010;211:195–199.

5. Ishii T, Asuwa N, Masuda S, Ishikawa Y. The effects of a myocardial bridge on coronary atherosclerosis and ischaemia. J. Pathol. 1998;185:4–9.

6. Ishikawa Y, Akasaka Y, Ito K, et al. Significance of anatomical properties of myocardial bridge on atherosclerosis evolution in the left anterior descending coronary artery. Atherosclerosis 2006;186:380–389.

7. Rubina K, Kalinina N, Efimenko A, et al. Adipose stromal cells stimulate angiogenesis via promoting progenitor cell differentiation, secretion of angiogenic factors, and enhancing vessel maturation. Tissue Eng. Part A 2009;15:2039–50.

8. Corselli M, Chen C-W, Sun B, Yap S, Rubin JP, Péault B. The tunica adventitia of human arteries and veins as a source of mesenchymal stem cells. Stem Cells Dev. 2012;21:1299–308.

9. Moreno PR, Fuster V. New aspects in the pathogenesis of diabetic atherothrombosis. J. Am. Coll. Cardiol. 2004;44:2293–2300.

10. Hayden MR, Tyagi SC. Vasa vasorum in plaque angiogenesis, metabolic syndrome, type 2 diabetes mellitus, and atheroscleropathy: a malignant transformation. Cardiovasc. Diabetol. 2004;3:1.

11. Moreno PR, Purushothaman KR, Fuster V, et al. Plaque neovascularization is increased in ruptured atherosclerotic lesions of human aorta: implications for plaque vulnerability. Circulation 2004;110:2032–8.

12. Michel J-B, Virmani R, Arbustini E, Pasterkamp G. Intraplaque haemorrhages as the trigger of plaque vulnerability. Eur. Heart J. 2011;32.

13. Ip JH, Fuster V, Badimon L, Badimon J, Taubman MB, Chesebro JH. Syndromes of accelerated atherosclerosis: role of vascular injury and smooth muscle cell proliferation. J. Am. Coll. Cardiol. 1990;15:1667–87.

14. Orlandi A. The contribution of resident vascular stem cells to arterial pathology. Int. J. stem cells 2015;8:9–17.

15. Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, 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. Circulation 1995;92:1355–74.

16. Peña E, Arderiu G, Badimon L. Subcellular localization of tissue factor and human coronary artery smooth muscle cell migration. J. Thromb. Haemost. 2012;10:2373–82.

17. Verhagen SN, Visseren FLJ. Perivascular adipose tissue as a cause of atherosclerosis. Atherosclerosis 2011;214:3–10.

18. Henrichot E, Juge-Aubry CE, Pernin A, et al. Production of chemokines by perivascular adipose tissue: a role in the pathogenesis of atherosclerosis? Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 2005;25:2594–9.

19. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. Cytotherapy 2006;8:315–7.

20. Rehman J, Traktuev D, Li J, et al. Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. Circulation 2004;109:1292–8.

21. Matsuda K, Falkenberg KJ, Woods AA, Choi YS, Morrison WA, Dilley RJ. Adipose-derived stem cells promote angiogenesis and tissue formation for in vivo tissue engineering. Tissue Eng. Part A 2013;19:1327–35.

22. Bekhite MM, Finkensieper A, Rebhan J, et al. Hypoxia, leptin, and vascular endothelial growth factor stimulate vascular endothelial cell differentiation of human adipose tissue-derived stem cells. Stem Cells Dev. 2014;23:333–51.

23. Amos PJ, Shang H, Bailey AM, Taylor A, Katz AJ, Peirce SM. IFATS collection: The role of human adipose-derived stromal cells in inflammatory microvascular remodeling and evidence of a perivascular phenotype. Stem Cells 2008;26:2682–90.

24. Bennett MR, Sinha S, Owens GK. Vascular Smooth Muscle Cells in Atherosclerosis. Circ. Res. 2016;118:692–702.

25. Chen J, Bierhaus A, Schiekofer S, et al. Tissue Factor - A Receptor Involved in the Control of Cellular Properties, Including Angiogenesis. Thromb. Haemost. 2001;86:334–45.

26. Arderiu G, Peña E, Aledo R, Juan-Babot O, Badimon L. Tissue factor regulates microvessel formation and stabilization by induction of chemokine (C-C motif) ligand 2 expression. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 2011;31:2607–15.

27. Arderiu G, Peña E, Badimon L. Angiogenic microvascular endothelial cells release microparticles rich in tissue factor that promotes postischemic collateral vessel formation. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 2015;35:348–57.

28. Drake TA, Morrissey JH, Edgington TS. Selective cellular expression of tissue factor in human tissues. Implications for disorders of hemostasis and thrombosis. Am. J. Pathol. 1989;134:1087–97.

29. Ferro D, Basili S, Alessandri C, et al. Simvastatin reduces monocyte-tissue-factor expression type IIa hypercholesterolaemia. Lancet 1997;350:1222.

30. Puccetti L, Bruni F, Bova G, et al. Role of platelets in tissue factor expression by monocytes in normal and hypercholesterolemic subjects. In vitro effect of cerivastatin. Int. J. Clin. Lab. Res. 2000;30:147–56.

31. Oñate B, Vilahur G, Camino-López S, et al. Stem cells isolated from adipose tissue of obese patients show changes in their transcriptomic profile that indicate loss in stemcellness and increased commitment to an adipocyte-like phenotype. BMC Genomics 2013;14:625.

32. Ferrer-Lorente R, Bejar MT, Tous M, Vilahur G, Badimon L. Systems biology approach to identify alterations in the stem cell reservoir of subcutaneous adipose tissue in a rat model of diabetes: effects on differentiation potential and function. Diabetologia 2014;57:246–56.

33. Bejar MT, Ferrer-Lorente R, Peña E, Badimon L. Inhibition of Notch rescues the angiogenic potential impaired by cardiovascular risk factors in epicardial adipose stem cells. FASEB J. 2016;30:2849–59.

34. Boye E, Olsen BR. Signaling mechanisms in infantile hemangioma. Curr. Opin. Hematol. 2009;16:202–8.

35. Arderiu G, Peña E, Aledo R, Espinosa S, Badimon L. Ets-1 transcription is required in tissue factor driven microvessel formation and stabilization. Angiogenesis 2012;15:657–69.

36. Arderiu G, Espinosa S, Peña E, Aledo R, Badimon L. PAR2-SMAD3 in microvascular endothelial cells is indispensable for vascular stability via tissue factor signaling. J. Mol. Cell Biol. 2016;8:255–70.

37. Herrmann J, Lerman LO, Rodriguez-Porcel M, et al. Coronary vasa vasorum neovascularization precedes epicardial endothelial dysfunction in experimental hypercholesterolemia. Cardiovasc. Res. 2001;51:762–6.

38. Peña E, Arderiu G, Badimon L. Tissue factor induces human coronary artery smooth muscle cell motility through Wnt-signalling. J. Thromb. Haemost. 2013;11:1880–91.

TABLE 1. Patients' clinical and demographic characteristics

	All	Low CVRF clustering patients (CVRF/DLP-)	High CVRF clustering patients (CVRF/DLP^{+})
Gender (m/f)	8/7	4/2	4/5
Age	52.7 ± 12.6	45.3 ± 13.4	57.7 ± 9.8
BMI	26.1 ± 5.4	22.7 ± 2.4	28.3 ± 5.7*
Nº CVRF	1.7 ± 0.1	0.3 ± 0.5	2.4 ± 1.0***
Dyslipidemia	9; 60%	0; 0%	9; 100%***
Obesity (n;%)	5; 33.3%	0; 0%	5; 55.5%*
Hypertension (n;%)	7; 46.7%	1; 16.7%	6; 66.6%
Diabetes (n;%)	2; 13.3%	0; 0%	2; 22.2%
Smoker status			
Ex-smoker	8; 53.3%	2; 33.3%	6; 66.6%
Current smoker	2; 13.3%	1; 16.7%	1; 16.7%
Statins treatment	9; 60%	0; 0%	9; 100%***
LAD coronary lesion			
AIT-II-III	5; 33.3%	4; 66.7%	1; 11.1%
IV-VIII	10; 66.7%	2; 33.3%	8; 88.9%

*p<0.05 vs CVRF/DLP- patients; ***p<0.001 vs CVRF/DLP- patients.

FIGURE 1

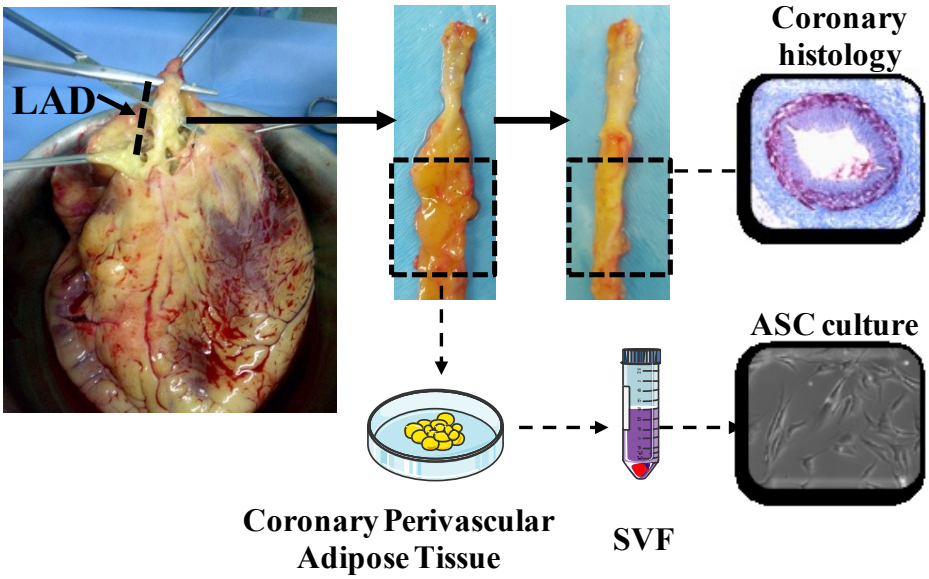


Figure 1. Sample collection. Left anterior descending (LAD) coronary artery was exposed and adipose tissue directly attached to the artery was dissected and processed to obtain the ASCs. LAD coronary was fixed and analyzed by immunohistochemistry. SVF: stromal vascular fraction; ASC: adipose derived-stem cells.

FIGURE 2

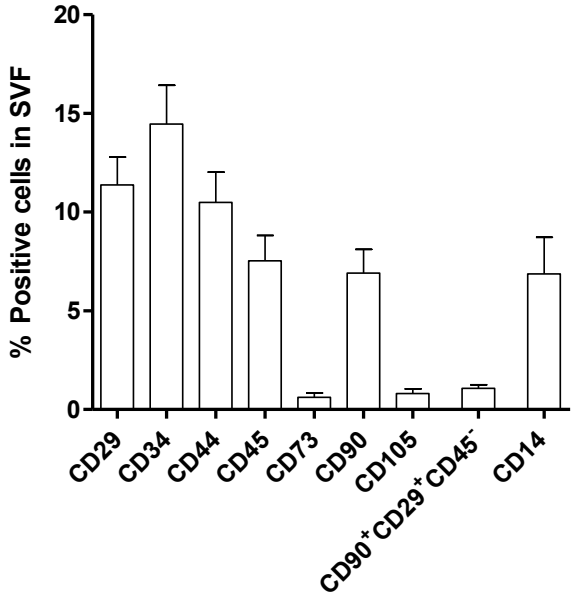


Figure 2. Flow cytometry analysis of the SVF. SVF from LAD coronary perivascular adipose tissue was analyzed by flow cytometry for mesenchymal stem cell markers and a monocyte/macrophage marker. SVF: stromal vascular fraction.

FIGURE 3

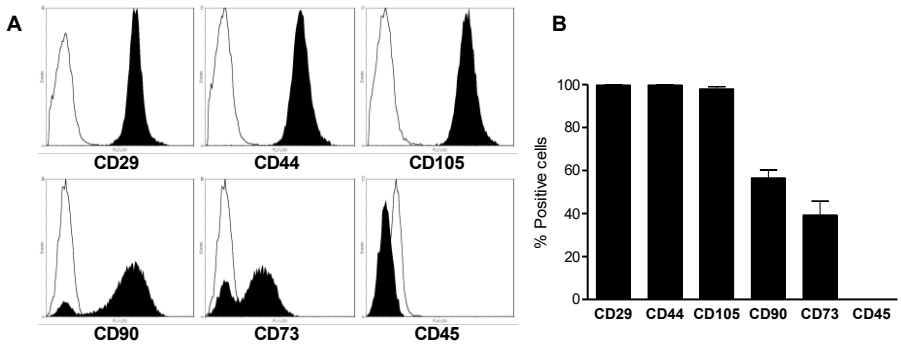


Figure 3. ASC phenotypic characterization by flow cytometry analysis. Surface mesenchymal stem cell markers were analyzed in coronary perivascular ASCs at passage 3. A. Filled histograms show positive staining; open histograms correspond to isotype controls. B. FACS data are presented as percentage of positive cells.

FIGURE 4

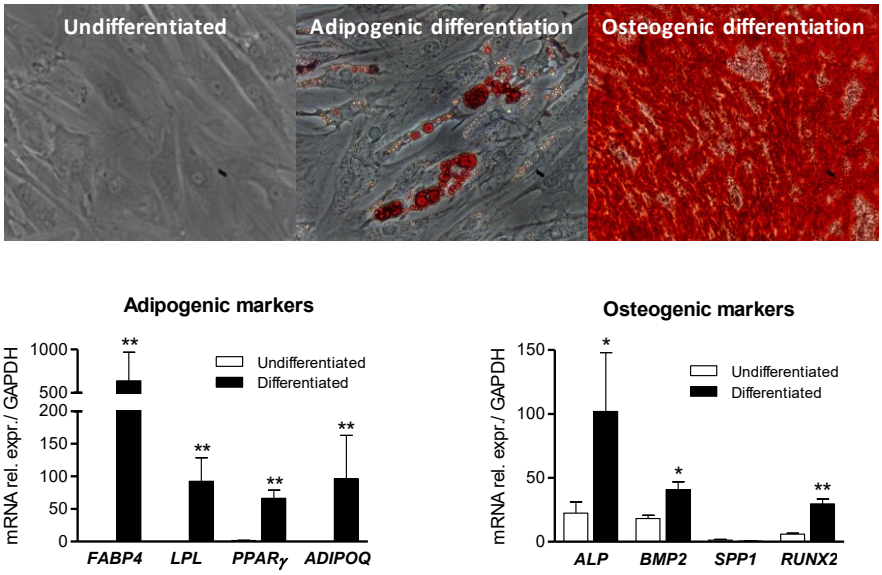


Figure 4. Adipogenic and osteogenic differentiation of coronary perivascular ASCs. Differentiation was evaluated by specific staining and RT-PCR. Adipogenic differentiation was evidenced by lipid droplets stained by Oil red. Alizarin red staining showed extracellular calcium deposition. *p<0.05; **p<0.01 vs undifferentiated.

FIGURE 5

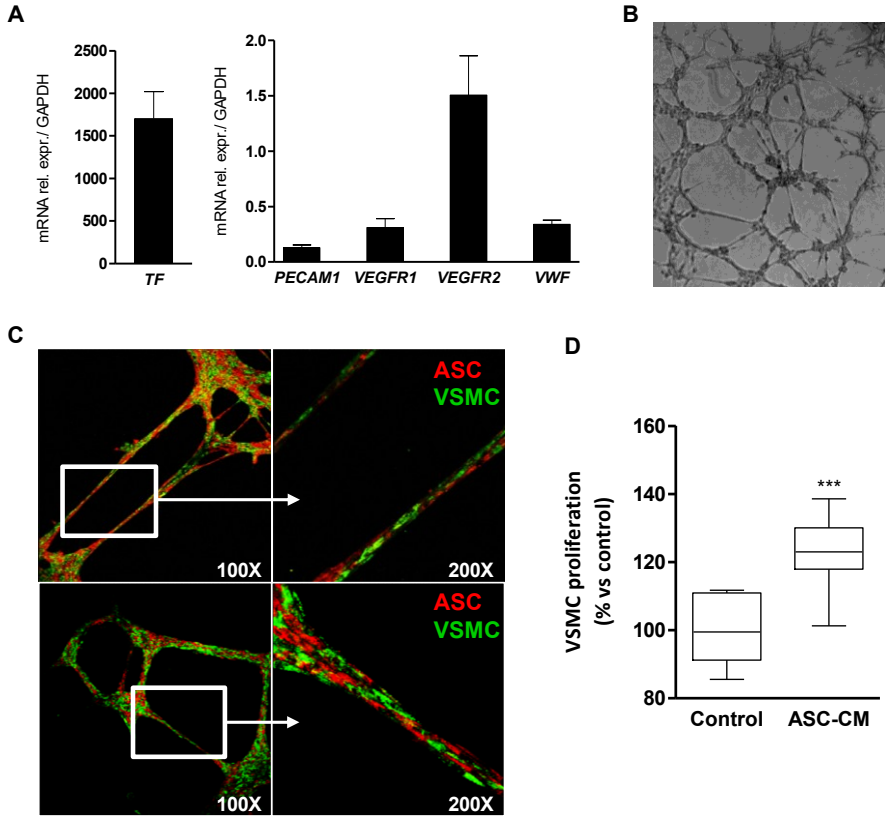


Figure 5. Angiogenic potential in vitro of coronary perivascular ASCs. A. mRNA expression analysis of Tissue factor and angiogenesis-related genes in ASCs at passage 3. B. Representative image of ASCs in matrigel-based angiotube formation assay (40X magnification). C. Co-culture of ASC (red) and VSMC (green) in matrigel led to organized tubular networks. D. ASC-conditioned medium (ASC-CM) treatment during 24h increased the proliferation of VSMC compared to control medium. ***p<0.001 vs control.

FIGURE 6

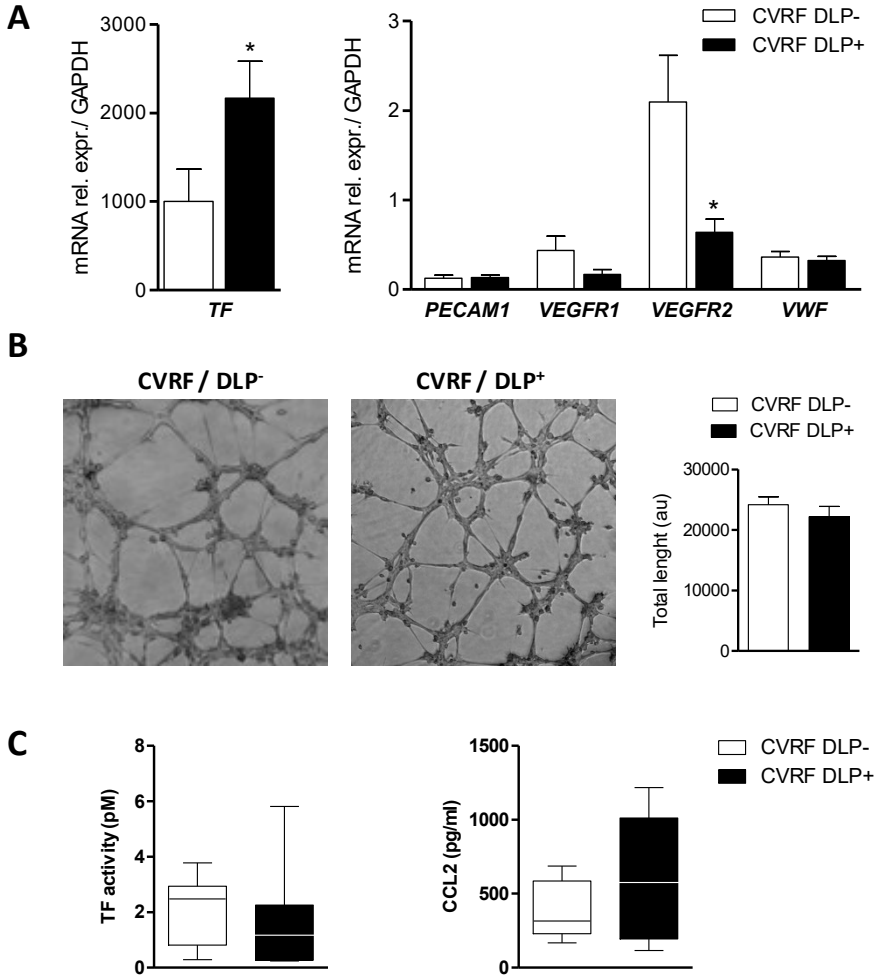


Figure 6. Angiogenic potential of PVAT-ASCs. Comparison of angiogenic properties of ASCs from patients with high CVRF clustering with a predominance of dyslipidemia (CVRF/DLP+) and patients with low CVRF clustering (CVRF/DLP-). A. mRNA expression analysis of Tissue factor and angiogenesis-related genes in ASCs at passage 3. B. Representative image of ASCs in matrigel-based angiotube formation assay (40X magnification) and total tube lenght. C. Tissue factor activity and CCL2 protein detected in ASCs-conditioned medium. *$p<0.05$ vs CVRF/DLP-.

FIGURE 7

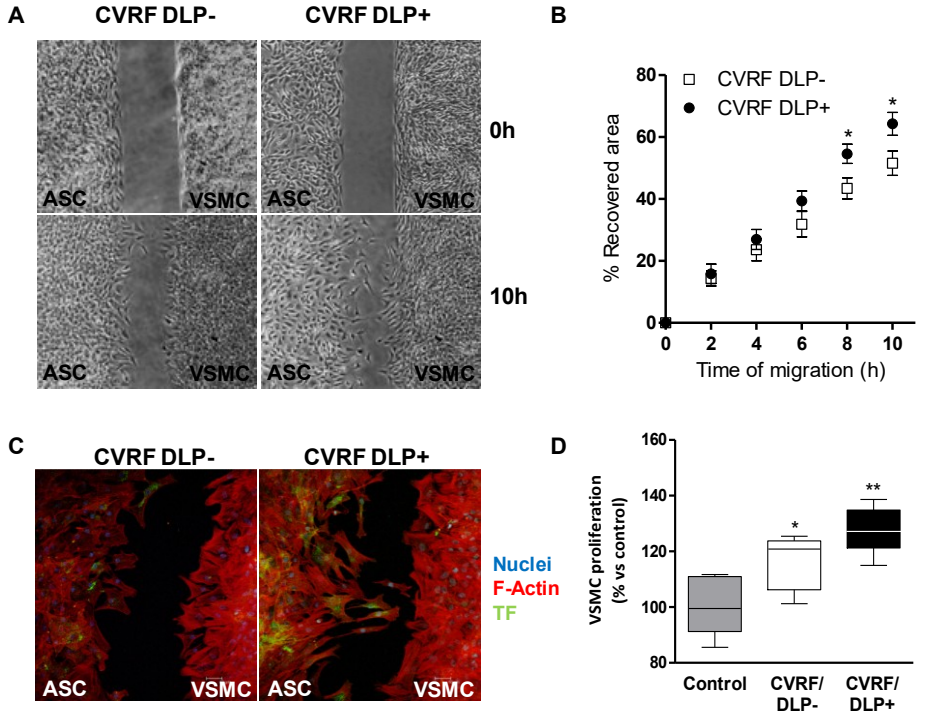


Figure 7. Wound healing assay in a co-culture of ASC and VSMC. A. Representative images of the wound at start and end point of migration (40X magnification). B. Percentage of recovered area. C. Immunofluorescence showing tissue factor expression (green) after 10 hours of migration (200X magnification). D. VSMC proliferation assay after 24h-treatment with ASC-conditioned medium from CVRF/DLP+ and CVRF/DLP- patients. *p<0.05; *p<0.01 vs control.

FIGURE 8

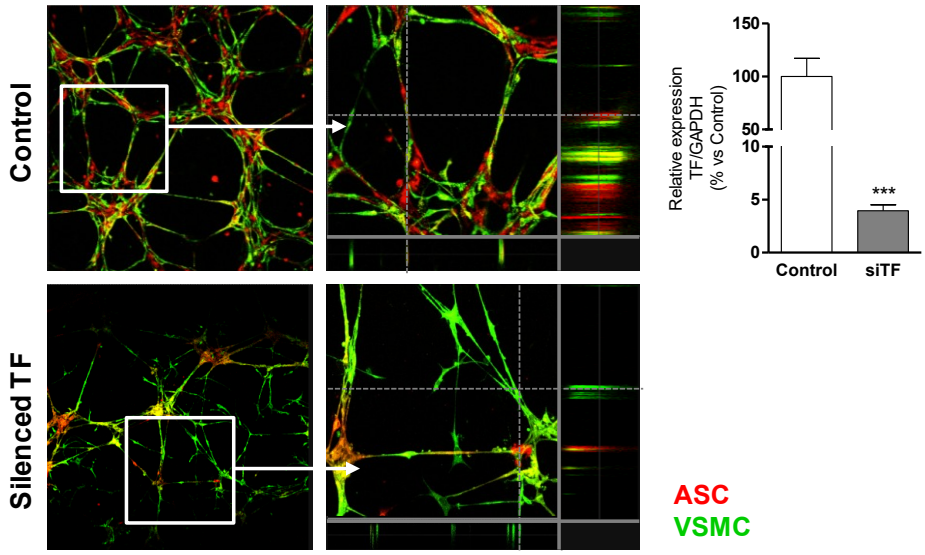


Figure 8. Tissue factor silencing in ASCs. Silencing of F3 (gene encoding TF protein) in ASC (red) inhibited the formation of tubular organized structures in combination with VSMC (green). Z-sections show ASC-VSMC intercalation. ***p<0.001 vs control.

FIGURE 9

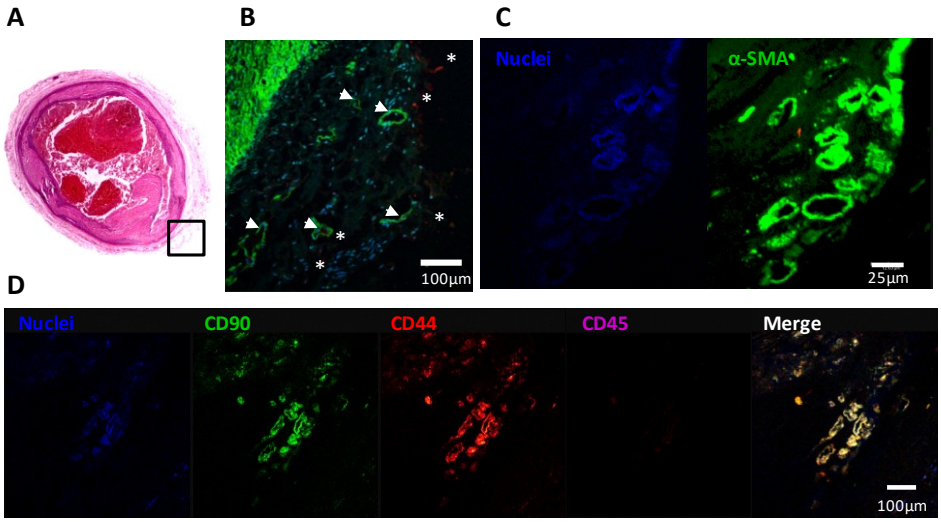


Figure 9. Serial sections of LAD coronary arteries analyzed by hematoxylin/eosin staining and immunofluorescence. A. LAD showing advanced atherosclerotic lesion. Square shows the area analyzed in B, C and D. B. Immunofluorescence staining for α-SMA (green) and TF (red). Head arrows show microvessels. Asterisks indicate TF staining. C-D. Area with high density of microvessels co-localized with ASCs (CD90+CD44+CD45- staining).

TABLE S1. List of Taqman gene expression assay probes used in RT-PCR.

Gene symbol	TaqMan gene expression assays reference
ADIPOQ	Hs00605917_m1
ALP	Hs01029144_m1
BMP2	Hs00154192_m1
FABP4	Hs01086177_m1
GAPDH	Hs02758991_g1
LDLR	Hs01092524_m1
LPL	Hs00173425_m1
MMP-9	Hs00234579_m1
PECAM1	Hs01065282_m1
PPARG	Hs00234592_m1
RUNX2	Hs01047973_m1
SPP1	Hs00959010_m1
TF	Hs00175225_m1
VEGFA	Hs00900055_m1
VEGFR1	Hs01052961_m1
VEGFR2	Hs00911700_m1
VWF	Hs01109446_m1

DISCUSIÓN

Las enfermedades cardiovasculares son un ejemplo ilustrativo de enfermedad multigénica y compleja, que engloban diversos estados evolutivos y eventos patológicos. Las diferencias en su manifestación se atribuyen a diversos determinantes ambientales, genéticos y de comportamiento, y a la interacción entre ellos. En la investigación sobre la enfermedad cardiovascular, prevalecen dos objetivos científicos: mejorar la predicción de futuros eventos clínicos y entender los procesos patológicos subyacentes a la enfermedad, y por extensión, identificar potenciales dianas terapéuticas y preventivas.

Los factores de riesgo cardiovascular son una serie de condiciones que favorecen la aparición de eventos cardiovasculares[20] y que permiten estratificar a los pacientes estimando su probabilidad de desarrollar enfermedad cardiovascular dentro de un período de tiempo determinado.

El tejido adiposo es un órgano que está directamente implicado en la regulación de la homeostasis energética, y que participa en la mayor parte de mecanismos patológicos que desembocan en la aparición de FRCV, como la obesidad y la resistencia a insulina.

Las ASC son una opción terapéutica emergente dentro del campo de la medicina regenerativa, que está siendo exhaustivamente estudiada en el tratamiento de múltiples patologías[190]. Sin embargo, hasta ahora se ha dedicado poca atención a estudiar el papel fisiológico de estas células madre adultas que se encuentran en relativa abundancia en todas las localizaciones adiposas y que posiblemente tienen una función en la reparación espontánea de órganos y sistemas.

Los trabajos que forman parte de esta tesis se centran en analizar las diferencias intrínsecas de las ASC en función del depósito de grasa al que pertenecen, y en evaluar el efecto que tiene la presencia de FRCV sobre las propiedades de esta población celular. El objetivo global es poder descifrar el papel que las ASC pueden ejercer en la regeneración o reparación espontánea de los órganos rodeados por el tejido adiposo en el que residen, y en su defecto, las disfunciones que la pérdida de funcionalidad de las ASC puede comportar para dicho órgano.

Un incremento del volumen de tejido adiposo visceral se ha asociado clínicamente con un mayor riesgo de desarrollar síndrome metabólico, enfermedad de las arterias coronarias, hipertensión y dislipemia, significativamente superior en comparación con un incremento de la grasa con distribución periférica o subcutánea[191]. Una de las características que explican la asociación de la grasa visceral con un mayor riesgo cardiovascular es su limitada capacidad de expansión en comparación con la subcutánea, que puede resultar en una acumulación ectópica de lípidos (lipotoxicidad)[192] y un estado pro-inflamatorio[193]. Sin embargo, no se conocen los mecanismos que regulan las diferentes capacidades de expansión de los depósitos de grasa subcutáneos y viscerales.

La generación de nuevos adipocitos requiere de la determinación de las células madre mesenquimales hacia progenitores adipocíticos (preadipocitos) y la diferenciación terminal a adipocitos maduros[84]. Aunque el proceso de diferenciación terminal ha sido ampliamente estudiado, existe poca información sobre el proceso que regula la determinación de las células madre hacia el linaje adipocítico, por lo que nuestro primer objetivo fue detectar diferencias en las ASC inherentes al tejido en el que residen.

Con ese fin, el primer paso en este estudio fue caracterizar las ASC de los cinco principales depósitos de tejido adiposo blanco, tanto en una situación fisiológica (ratas sanas) como en una situación patológica de acumulación de FRCV (ratas ZDF, diabéticas y obesas). Los resultados más destacables de esta primera aproximación fueron los relativos al patrón global de expresión génica de estas células, que mostraba claras diferencias en función de su origen. Mediante el análisis de componentes principales se observó una separación evidente entre el perfil de expresión de las ASC de localización subcutánea y las de los depósitos viscerales, resultado que se acentuó en ratas obesas diabéticas. Estos resultados demuestran que las diferencias en los niveles de expresión génica de los distintos tejidos adiposos descritas en estudios previos[194,195], no son exclusivamente debidas a modificaciones en los adipocitos maduros, ya que por lo menos las ASC participan de estos cambios. Un análisis más detallado del transcriptoma de las ASC mostró una mayor expresión de genes relacionados con el mantenimiento de la multipotencia en las que

provenían de depósitos de grasa viscerales, sugiriendo un estado más indiferenciado de éstas respecto a las ASC de grasa subcutánea.

Los ensayos de proliferación y diferenciación adipogénica de las ASC fueron coherentes con estudios previos en los que se describe una menor tasa proliferativa, así como una menor capacidad de diferenciación a adipocitos por parte de las ASC de origen visceral en comparación con las de origen subcutáneo[82,83]. Mientras que un alto porcentaje de las ASC de tejido adiposo subcutáneo se diferenciaron al linaje adipocítico y almacenaron eficientemente gotas lipídicas in vitro, las ASC de origen visceral sometidas a la misma inducción, presentaron un fenotipo menos diferenciado, con un menor número de células almacenando lípidos y una menor expresión de genes marcadores de diferenciación adipogénica. De nuevo, estas diferencias se incrementaron en ratas obesas y diabéticas, ya que ante una situación de exceso de energía y acumulación de factores de riesgo, las ASC subcutáneas incrementaron notablemente su capacidad de diferenciación adipogénica. Esta nueva observación concuerda con estudios previos de nuestro grupo, en los que se han descrito modificaciones en el perfil de expresión génica de las ASC residentes en el tejido adiposo subcutáneo de pacientes con obesidad mórbida (IMC > 40kg/m2) en comparación con individuos no obesos[196]. Los genes modificados en ese estudio estaban relacionados con la regulación de la multipotencia, el destino de linaje celular y la inflamación; mostrando en general una pérdida de la multipotencia a favor de una mayor diferenciación adipogénica.

Es interesante el hecho de que no todos los depósitos viscerales presentaron las mismas características. Las ASC aisladas de grasa subcutánea y mesentérica se situaron en las posiciones más extremas en cuanto a la capacidad de diferenciación adipogénica o el perfil de expresión génica. En cambio, las ASC obtenidas de los demás tejidos considerados viscerales presentaron características algo más intermedias. El tejido adiposo retroperitoneal fue el más cercano a las características del subcutáneo, mientras que el epicárdico se acercó más al mesentérico, y el epididimal quedó en una posición intermedia, sobretodo en cuanto a potencial adipogénico.

Puesto que la vía de señalización Notch ha demostrado estar implicada en la regulación de los procesos de diferenciación de las ASC a varios linajes celulares[158–161], se analizó la expresión génica de sus componentes. Después de observar que la mayoría de ligandos y receptores de la vía están expresados en las ASC, se prestó una especial atención a los genes diana de la vía canónica de Notch (familia Hes/Hey), que son indicadores del grado de activación de la misma. Según los resultados de PCR a tiempo real, las ASC de los depósitos mesentérico, epicárdico y epididimal expresaron niveles de algunos de los genes diana de Notch del orden de 10 a 100 veces superior respecto a las del depósito subcutáneo. Estas diferencias entre tejidos siguen una tendencia muy similar a la encontrada entre distintos depósitos de grasa durante la diferenciación adipogénica, por lo que se decidió investigar la implicación de la vía de Notch en el potencial de diferenciación adipogénico de las ASC. Para ello, se trataron las ASC de origen subcutáneo y mesentérico (como representación de la localización visceral) con un activador y un inhibidor de la vía de señalización Notch, previamente a la inducción adipogénica. Los resultados del tratamiento revelaron la implicación de la vía de Notch en la regulación de la capacidad adipogénica en las ASC. En las ASC de origen subcutáneo, donde la señalización Notch estaba reducida en comparación con otras localizaciones, una activación de la vía (confirmada mediante el análisis de expresión de los genes diana) dio lugar a una reducción en la expresión de los marcadores de diferenciación adipocíticos. Por otro lado, la inhibición de la señalización Notch en las ASC de origen visceral derivó en un aumento de los marcadores de diferenciación.

Los tratamientos de inhibición de la vía de Notch en las ASC subcutáneas y de activación en las viscerales no produjeron ningún cambio significativo en la expresión de marcadores de diferenciación. Esto se debe probablemente a los niveles basales de activación de Notch en estas células, de modo que un tratamiento inhibidor en una situación de poca activación de la vía no tendrá efectos en su señalización y viceversa.

Aunque el estudio de vías de señalización tan ampliamente expresadas y con una regulación compleja como la vía de Notch a menudo da lugar a datos contradictorios, diversos estudios han descrito una inducción de la diferenciación adipogénica en inhibir la señalización de esta vía en células progenitoras[159,161,197,198], en línea con los datos obtenidos en esta tesis.

Por lo tanto, los resultados de este trabajo aportan evidencias de la participación de la vía de señalización Notch en el proceso de diferenciación adipogénica de las ASC y la señalan como candidata a ser responsable de las diferencias intrínsecas de las ASC residentes en el tejido adiposo, en relación con su potencial de diferenciación, y por tanto, la capacidad de expansión de las distintas localizaciones adiposas. Así, la variación entre depósitos de grasa puede ser resultado de no únicamente influencias externas como el microambiente hormonal y paracrino, la disponibilidad local de nutrientes o las limitaciones anatómicas, sino también de las diferencias inherentes entre las ASC residentes.

Una menor capacidad de diferenciación por parte de las ASC de depósitos viscerales puede explicar en parte la reacción hipertrófica que se produce ante un exceso de energía, dándose una acumulación de los lípidos en los adipocitos ya existentes, y creándose grandes vacuolas lipídicas. En cambio, la mayor capacidad de diferenciación de las ASC subcutáneas resulta en la acumulación del exceso calórico en adipocitos nuevos y con vacuolas más pequeñas[199].

El grado de activación de la vía de señalización Notch se presenta por tanto como un regulador de la adipogénesis en las ASC, e indirectamente, también del riesgo metabólico. Aunque se requieren más estudios para conocer el papel concreto de los componentes de la vía que participan en este proceso, la modulación de la señalización Notch podría ser una diana terapéutica para promover un aumento en la capacidad de almacenamiento de determinadas localizaciones adiposas.

Por otro lado, en este estudio se ha hecho patente que la acumulación de FRCV, como la obesidad y la diabetes, induce una modificación de la expresión génica y fenotípica de las ASC. Cambios en la regulación de la multipotencia, el perfil de secreción de citoquinas y la capacidad de diferenciación, no sólo pueden derivar en un compromiso de las ASC hacia el linaje adipocítico que determine las propiedades del tejido adiposo, sino que pueden tener efectos en su potencial angiogénico y regenerativo, tanto de forma endógena como en el contexto de la terapia celular autóloga[190].

Las ASC autólogas representan una opción novedosa y prometedora para el tratamiento de las complicaciones isquémicas que requieren revascularización o reparación vascular[117,133,143,200]. Los pacientes diabéticos, con múltiples

complicaciones vasculares, son un colectivo que podría beneficiarse de este tipo de terapia. Sin embargo, una disfunción del potencial angiogénico en estas células como consecuencia de la misma presencia de diabetes u otros FRCV puede limitar la viabilidad de esta aproximación. Existen evidencias de los efectos negativos de la diabetes tanto en las MSC de médula ósea como en las células progenitoras endoteliales, que provocan una disminución de la proliferación, diferenciación endotelial, capacidad de adhesión o de incorporación a estructuras vasculares[201–203]. Otros factores de riesgo como la edad, la hipercolesterolemia o la hipertensión producen también una disminución en la capacidad de proliferación, migración y adhesión de las células progenitoras endoteliales, así como en su capacidad vasculogénica[204–206]. Algunos grupos, entre ellos el nuestro, han descrito ya algunos efectos deletéreos que produce en las ASC de tejido adiposo subcutáneo la presencia de FRCV como la obesidad, los altos niveles de glucosa, el tabaco y la avanzada edad[151,181,207–209]. Sin embargo, en el caso concreto de la diabetes tipo 2 y los factores de riesgo asociados, no se han identificado aún las alteraciones que sufren las ASC de tejido adiposo subcutáneo, lo que requiere más investigación en el tema, dado que son candidatas ideales para ser utilizadas en terapia regenerativa vascular debido a su potencial angiogénico, inmunomodulador, y a su fácil y poco invasiva obtención[140,143].

Con el fin de descubrir qué tipo de modificaciones se producen en las ASC residentes en el tejido adiposo subcutáneo en presencia de diabetes y otros FRCV, se utilizó de nuevo el modelo animal de ratas ZDF, y se compararon fenotípica y funcionalmente con las ASC de animales sanos sin presencia de FRCV.

El análisis del transcriptoma de las ASC reveló una tendencia de regulación a la baja de genes relacionados con la multipotencia y los marcadores de células madre. De forma destacable, se encontró una reducción en la expresión del gen Fibroblast growth factor 4 (Fgf4), involucrado en la actividad mitogénica y la supervivencia celular[210], y de POU class 5 homeobox 1 (Pou5f1) también conocido como Oct4, que codifica para un factor esencial en el mantenimiento del estado pluripotente y la auto-renovación en las células madre[211].

El análisis global de los resultados mediante el programa bioinformático Ingenuity pathway analysis (IPA) permite la presentación de los datos

obtenidos en un contexto de biología de sistemas, interpretando los resultados como un sistema integrado e interrelacionado de genes, proteínas y reacciones bioquímicas, que da lugar a procesos biológicos. Este abordaje dio lugar a la identificación de vías de señalización importantes en el mantenimiento de la multipotencia en las células madre que estaban claramente afectadas en las ASC por la acumulación de factores de riesgo, entre las que destacó la vía de señalización Notch, seguida por la señalización Wnt-β-catenin y los factores de crecimiento de la familia Fibroblast Growth Factor (FGF). Además, el programa IPA predijo a partir de los datos de expresión génica una disminución de la proliferación y un incremento de la apoptosis en las ASC de animales ZDF, que fueron confirmados posteriormente en estudios in vitro.

Varios grupos han demostrado cambios en las propiedades de las ASC como consecuencia de las diferentes condiciones del cultivo y la expansión de las MSC[212–214]. Para verificar que las diferencias observadas entre ambos grupos de ASC eran debidas a la diabetes junto con los demás FRCV, y descartar la posibilidad de que los cambios fueran inducidos por el cultivo y la expansión in vitro, se analizaron las diferencias en la expresión génica del tejido adiposo subcutáneo y la SVF de los dos grupos de animales. Estos análisis mostraron diferencias incluso más importantes entre los dos grupos de las que se encontraron en las ASC en cultivo, con una regulación a la baja generalizada de los genes marcadores de célula madre mesenquimal y de los involucrados en el mantenimiento de la multipotencia. Este resultado sugiere que la presencia de diabetes y FRCV puede estar reduciendo tanto el número como la multipotencia de las células madre residentes en el tejido adiposo subcutáneo, y que estos cambios permanecen después del aislamiento y cultivo de las ASC.

Una reducción en la expresión de genes característicos de las células madre como Pou5f1 y Sox2, involucrados en el mantenimiento de un estado indiferenciado, puede derivar en un aumento de la diferenciación de las MSC[215–217], por lo que se analizó la capacidad de diferenciación de las ASC de ambos grupos hacia los linajes osteogénico, adipogénico y endotelial.

La inducción adipogénica de las ASC de ratas ZDF dio lugar a un mayor número de células diferenciadas, con visibles gotas lipídicas en su interior y una mayor expresión de marcadores característicos de adipocitos (Cd36, Fabp4 y Lpl) en comparación con las ASC de ratas delgadas sin FRCV, en línea con lo que se

había observado en el estudio anterior. Los mecanismos transcripcionales que regulan la adipogénesis y la osteogénesis se basan en parte en la actividad de receptores nucleares y la unión a sus ligandos. Uno de estos receptores es el Peroxisome Proliferator Activated Receptor gamma (PPARγ), cuyos ligandos incluyen ácidos grasos de cadena larga, derivados oxidados de ácidos grasos y las tiazolidinedionas[218]. El incremento en la expresión de Pparγ respecto a los niveles basales (de las ASC no diferenciadas) fue significativamente superior en las ASC de ratas ZDF. Esta observación puede explicar en parte la menor capacidad de diferenciación osteogénica mostrada por estas células, ya que se ha descrito que la activación de PPARγ promueve la adipogénesis al mismo tiempo que inhibe la osteogénesis[219,220]. Además, se conoce que la expresión del gen Fibroblast growth factor 2 (Fgf2), disminuida en los animales ZDF, promueve la diferenciación osteogénica y condrogénica de las MSC, observándose además un marcado aumento de adipocitos en cultivos de MSC de médula ósea de animales Fgf2−/− [221].

Varios autores han descrito las propiedades pro-angiogénicas de las ASC, basadas en su actividad paracrina y el potencial de diferenciación a célula endotelial[131,133,222]. Estudios previos de nuestro grupo han descrito que la obesidad afecta el potencial de diferenciación de las ASC hacia el fenotipo endotelial[181]. Los resultados de estas tesis demuestran, además, que en animales con acumulación de factores de riesgo, incluyendo diabetes y obesidad, las ASC del tejido adiposo subcutáneo ven reducida tanto su capacidad para formar estructuras tubulares in vitro como su potencial pro-angiogénico in vivo.

La disfunción angiogénica de las ASC en animales con FRCV puede tener distintos orígenes. Por un lado, las vías de señalización Notch y Wnt-β-catenin están involucradas en la regulación del desarrollo vascular vascular y la especificación de las células endoteliales[223,224], por lo que la alteración de estas vías podría limitar la diferenciación hacia el linaje endotelial o la habilidad para formar redes de estructuras tubulares en una matriz tridimensional. Por otro lado, se detectaron en estas células altos niveles de collagen XVIII (Col18a1), precursor de la proteína anti-angiogénica endostatin, la cual disminuye específicamente la proliferación, migración y la formación de tubos de las células endoteliales[225,226].

Puesto que el modelo animal escogido es deficiente en el receptor de leptina, y ésta ha demostrado tener efectos periféricos en la regulación de la diferenciación de MSC de médula ósea[227], se indujo químicamente diabetes tipo 2 a los animales utilizados hasta ahora como controles. Como resultado, las ASC de estos animales diabéticos, pero no obesos ni deficientes en el receptor de leptina, mostraron un comportamiento muy similar a las de los animales ZDF, al presentar una determinación hacia el linaje adipogénico en detrimento de la diferenciación osteogénica y endotelial.

Por tanto, los resultados de este estudio demuestran que la diabetes tiene importantes efectos en las principales vías de señalización implicadas en el mantenimiento de la multipotencia o el estado indiferenciado de las células madre, y que esto puede comprometer la viabilidad, la plasticidad y la auto-renovación de las ASC de tejido adiposo subcutáneo, y consecuentemente, reducir la eficacia las estrategias de terapia celular autóloga regenerativa en pacientes diabéticos con FRCV.

Estudios posteriores al nuestro, han descrito otras vías por las que la diabetes o la obesidad podrían contribuir a reducir el potencial angiogénico de las ASC de tejido adiposo subcutáneo: la depleción selectiva de ciertas subpoblaciones celulares de ASC (CD34+CD31-CD45-) [228], o la reducción del contenido de VEGF, MMP-2 y miR-126 en las vesículas extracelulares generadas por las ASC[229].

La identificación de las vías responsables de un menor potencial angiogénico de las ASC es imprescindible no sólo para hallar el origen de la baja autoreparación tisular espontánea o la reducida efectividad de algunos tratamientos, sino que son necesarios para llevar a cabo distintos abordajes en la prevención y la reparación del daño tisular mediante células madre adultas.

La renovación de cardiomiocitos está aumentada en condiciones patológicas como el infarto de miocardio o la insuficiencia cardíaca[230,231], lo que sugiere que tejidos como el cardíaco tienen cierta capacidad de regeneración, aunque es limitada e incapaz de compensar daños significativos. El reclutamiento de MSC de médula ósea se ha asociado a la reparación cardíaca[232], y recientemente, mediante análisis histológicos, se han detectado ASC endógenas localizadas en heridas de la dermis en proceso de curación[233]. Además, se ha demostrado que la administración de MSC estimula la expresión de varios genes responsables de la migración celular, incluyendo los ejes C-X-C Motif Chemokine Ligand 12/C-X-

C Motif Chemokine Receptor 4 (CXCL2/CXCR4), Platelet Derived Growth Factor/Platelet Derived Growth Factor Recetor (PDGF/PDGFR), y Vascular Endothelial Growth Factor/Vascular Endothelial Growth Factor Receptor (VEGF/VEGFR), lo que podría mobilizar células madre endógenas con capacidad regenerativa[234].

Potenciar los procesos que ocurren de manera natural en la reparación tisular es una estrategia prometedora para la reconstrucción de los tejidos cardíacos dañados después de un infarto de miocardio[235]. Muy recientemente se han empezado a diseñar estrategias para estimular el potencial regenerativo de las células madre endógenas, utilizando desde exosomas de células madre embrionarias hasta pequeñas moléculas como la Apelin-13, que promueven un aumento en la migración, supervivencia y la proliferación de células progenitoras endógenas en el músculo cardíaco[236,237].

La afectación de las propiedades pro-angiogénicas de las ASC por la presencia de FRCV puede ser un componente perjudicial durante los procesos de regeneración endógena. Por su proximidad al corazón y a las arterias coronarias, el tejido adiposo epicárdico es de gran interés en el estudio de las enfermedades cardiovasculares, y de hecho, se ha asociado un mayor volumen de esta grasa con la presencia de FRCV como la diabetes o la obesidad, y con la severidad de la enfermedad arterial coronaria[99,238,239]. Por su localización, las ASC residentes en este tejido son candidatas a participar de los mencionados procesos de regeneración cardíaca endógena, así como en los procesos metabólicos, angiogénicos e inflamatorios relacionados con el tejido adiposo epicárdico. Es sorprendente, sin embargo, el reducido número de estudios que existe sobre esta población celular en la literatura científica.

Nuestros resultados han demostrado que de forma similar a lo que encontramos en el tejido adiposo subcutáneo, la SVF del tejido adiposo epicárdico de ratas ZDF presenta una menor expresión de genes relacionados con la multipotencia, y además, un menor porcentaje de células positivas para marcadores de célula madre mesenquimal en comparación con las ratas sanas. Los ensayos de diferenciación in vitro no desvelaron sin embargo diferencias en la habilidad adipogénica y osteogénica de las ASC de ratas ZDF y controles. Este hallazgo es una comprobación más de las diferencias entre localizaciones adiposas, ya que tal y como se describió en el primer trabajo de esta tesis, los

depósitos viscerales no incrementan de forma suficiente su determinación adipogénica y no son capaces de asumir el requerimiento de nuevos adipocitos en una condición patológica de obesidad. De hecho, un estudio reciente ha descrito un deterioro de la capacidad adipogénica en las ASC de tejido adiposo epicárdico de pacientes con enfermedad cardiovascular. Capacidad que difiere en función del sexo, la presencia de diabetes, obesidad o enfermedad arterial coronaria[240].

La exposición a factores de crecimiento endotelial de las ASC de tejido adiposo epicárdico de ratas control estimuló la expresión de Pecam1 y Vascular endothelial growth receptor 2 (Vegfr2 o Kdr), coincidiendo con lo descrito en ratones en un estudio reciente[241]. La presencia de FRCV tuvo sin embargo una repercusión notable en el potencial angiogénico de las ASC, tanto en la diferenciación endotelial y formación de estructuras tubulares como a nivel paracrino.

El inhibidor de serin proteasas Plasminogen activator inhibitor-1 (Pai-1 o Serpine1), es un regulador clave del sistema de activación del plasminógeno, una cascada proteolítica implicada en varios procesos fisiológicos y patológicos que incluyen la trombolisis vascular, la inflamación, la curación de heridas y la neovascularización[242]. Pai-1, cuya expresión se ha observado aumentada en las ASC de animales de avanzada edad[243], es un inhibidor de la angiogénesis y de metaloproteasas de matriz extracelular, lo que interfiere con la formación de angiotubos[244]. La expresión de Pai-1 se mantuvo elevada en las ASC de ratas ZDF después de la inducción al fenotipo endotelial, lo que podría explicar su menor capacidad angiogénica. Cabe destacar también que PPARγ, más expresado en las ASC de ratas con FRCV, se ha definido también como un potente inhibidor de la angiogénesis[245].

En base a nuestros resultados previos, realizamos un análisis mediante PCR array dirigido específicamente a analizar la vía de señalización Notch, con el fin de identificar un posible papel de esta vía en las alteraciones observadas en las ASC de animales con FRCV, concretamente en la disminución de su potencial angiogénico.

El análisis reveló una mayor expresión de algunos de los genes diana a la vez que una regulación a la baja de elementos antagonistas de Notch, indicando una mayor activación de la vía en las ASC de animales diabéticos y obesos en

comparación con los controles. Altos niveles de activación de Notch se han correlacionado con quiescencia celular o con una lenta progresión del ciclo celular en células somáticas adultas[246,247]. Por otro lado, en células madre, se ha descrito que una activación de la señalización mantiene el potencial de auto-renovación a través de la activación de los genes Hes/Hey, que reprimen la expresión de factores de transcripción de diferenciación terminal específicos de tejido[248,249]. Por tanto, la activación de Notch observada en las ASC de ratas con FRCV podría estar manteniendo el estado indiferenciado de estas células, reduciendo así su capacidad de diferenciación endotelial.

El tratamiento inhibidor de Notch en las ASC de ratas ZDF redujo significativamente la expresión de los genes diana de la vía canónica, que fue particularmente marcada en el caso de Hey1 y HeyL. Estos dos factores actúan de forma cooperativa, y se ha observado que ratones doble knockout (Hey1-/-/HeyL-/-) agotan sus reservas en músculo esquelético de células satélite quiescentes, las cuales son esenciales para la regeneración, debido a una diferenciación prematura[250]. La reducción de la expresión de los genes diana de Notch dio lugar a una evidente mejora de la capacidad para formar estructuras tubulares así como de promover la formación de nuevos vasos sanguíneos. Este resultado puede deberse al cese de la represión de genes involucrados en la diferenciación endotelial, ocasionada por los altos niveles de los genes diana de Notch (Familia Hes/Hey). Los factores de transcripción Hey (Hey1, Hey2 y HeyL) actúan como represores transcripcionales directos. Se ha observado que en ventrículos cardíacos de embriones de ratón, los KO para Hey1/HeyL y Hey2 presentan un aumento de la transcripción de genes relacionados con la angiogénesis como Vegfr1 y Vegfr2[251]. No obstante, la expresión de estos factores de transcripción en células endoteliales es imprescindible para un correcto desarrollo vascular. Si Hey1 y Hey2 son suprimidos simultáneamente, aparece un defecto vascular embrionario muy temprano, con un remodelado angiogénico defectuoso y una falta de diferenciación arterial [252].

Es preciso mencionar que la vía de Notch no se limita a actuar únicamente a través de los factores de transcripción Hes/Hey. Un estudio reciente ha descubierto que esta vía regula también la expresión del micro ARN miR-342-5p, el cual reduce la expresión de marcadores endoteliales e incrementa la de marcadores mesenquimales[253].

Se ha propuesto que Notch2 y Jagged1, podrían actuar como pareja ligando-receptor durante el desarrollo vascular especializado en corazón, hígado y riñón[254]. Notch2 y Jagged1 son precisamente el receptor y ligando más expresados en las ASC de tejido adiposo epicárdico, lo que sugiere una posible participación de esta población celular en la formación y remodelado de la vascularización cardíaca.

Estas observaciones abren las puertas al desarrollo de nuevas estrategias para promover la neovascularización cardíaca después de un evento isquémico mediante la estimulación de las ASC endógenas, a través de la modulación de la vía de señalización Notch. Es importante, sin embargo, tener en cuenta que los receptores y ligandos Notch están influenciados por un amplio espectro de modificaciones post-traduccionales y otros procesos celulares que modulan fuertemente la actividad de la señalización Notch en contextos específicos[255,256], por lo que Notch puede tener distintos papeles en función del tipo celular, la localización o el proceso de diferenciación. Mientras que la activación de Notch conduce a un estado de quiescencia en las células madre, en las células endoteliales coordina los patrones de formación de brotes (sprouting) y ramificaciones en respuesta a VEGF [257]. Por tanto, se requieren estudios adicionales para encontrar una traslación terapéutica viable a los hallazgos aquí presentados.

El análisis conjunto de los resultados hasta ahora comentados confluye en que la activación de la vía de señalización Notch en las ASC, induce un estado quiescente en estas células, con un menor grado de determinación de linaje y un mayor mantenimiento de la multipotencia. Por otro lado, su inhibición en las ASC en un contexto patológico puede inducir la formación de nuevos adipocitos en detrimento de la diferenciación hacia otros linajes, así como del mantenimiento de una población residente de ASC multipotentes.

La pregunta que generan estos resultados es qué mecanismos modulan la vía de señalización Notch, especialmente en las localizaciones adiposas viscerales, donde la vía está más activada. Se ha demostrado que los productos de la glicación avanzada (AGEs, del inglés advanced glycation end products) pueden inducir la señalización Notch-Hes1 en células madre neurales[258], por lo que la diabetes podría estar participando en su activación en las ASC. Por otro lado, el incremento de volumen del tejido adiposo visceral induce inflamación

sistémica, lo que deriva en el reclutamiento de macrófagos y en un incremento de la secreción de citoquinas inflamatorias[259]. Este estado inflamatorio crónico está también relacionado con la hipercolesterolemia y la resistencia a insulina. Varios estudios han reportado un aumento en la expresión de los componentes de Notch en presencia de citoquinas inflamatorias[260], y en modelos de resistencia a insulina[261,262].

Es difícil identificar cuál de los factores de riesgo de nuestro modelo tiene mayor peso en la afectación funcional de las ASC, sin embargo, los pacientes suelen presentar también una acumulación de estos factores de riesgo, que a su vez tienen efectos sinérgicos más que acumulativos. Es necesario, por tanto, realizar un abordaje que represente la manera compleja y sinérgica en que se da esta situación.

Puesto que las ASC representan en torno al 1-3% del total de células de la SVF del tejido adiposo[119], el sistema más probable mediante el cual los FRCV tienen efecto en su fenotipo es la modificación de su nicho celular. La liberación de citoquinas, así como la variación de concentraciones de metabolitos, oxígeno, y otros componentes en el microambiente de las ASC, pueden generar cambios en su perfil de expresión génica. Se han observado alteraciones similares en MSC y en células endoteliales progenitoras en presencia de FRCV[152,153,263,264], lo que refuerza el concepto de que sea una condición patológica sistémica la que afecte el nicho de células madre/progenitoras, y en consecuencia éstas vean alterado su potencial regenerativo. Es importante destacar que según nuestros resultados, las ASC una vez aisladas y cultivadas, y por tanto, fuera de su nicho celular, mantienen las modificaciones producidas en el tejido de origen, en concordancia con lo observado en el caso de MSC de médula ósea[264]. Esto hace poco recomendable, en general, el uso de células madre de donantes con FRCV en terapia regenerativa.

Existen hoy en día terapias habituales en el tratamiento de neoplasias hematológicas, basadas en el trasplante de células madre hematopoyéticas procedentes de la médula ósea[265]. Los pacientes sometidos a este tipo de trasplantes, tienen un riesgo cardiovascular significativamente superior, incluyendo una elevada incidencia de enfermedad arterial coronaria, accidente cerebrovascular e insuficiencia cardíaca[55,56,266], así como una alta

probabilidad de desarrollar síndrome metabólico[57,58]. No obstante, y aunque se han valorado los efectos de los tratamientos previos al trasplante y la enfermedad injerto contra huésped, aún no se ha conseguido relacionar con éxito estos factores con el elevado riesgo cardiovascular observado.

Dado que nuestros resultados indican que los FRCV tienen un efecto deletéreo y permanente en las ASC (probablemente a través de alteraciones en su nicho celular), y teniendo en cuenta que otros estudios han descrito efectos similares en las MSC de médula ósea, decidimos analizar si el trasplante de las células de la médula ósea de donantes con FRCV puede favorecer el desarrollo de enfermedad cardiovascular en receptores sanos. Para ello, se extrajeron las células de la médula ósea de ratas con y sin acumulación de FRCV, y se trasplantaron a ratas sanas de la misma edad. El análisis del perfil lipídico de los receptores, 14 semanas después del trasplante, mostró un incremento significativo de la fracción de colesterol LDL en aquellos animales que habían recibido médula ósea de donantes con FRCV. El hígado tiene un papel principal en el metabolismo de los lípidos y las lipoproteínas, por lo que se analizó su perfil de expresión génica. Las células de la médula ósea de donantes con FRCV produjeron alteraciones significativas en la vía de señalización Farnesoid X Receptor/Retinoid X Receptor (FXR/RXR), involucrada en la regulación de los ácidos biliares y el colesterol[267,268]. Destacó, además, la alteración de la expresión de genes relacionados con la respuesta inflamatoria, lo que se confirmó al detectar niveles hepáticos significativamente superiores de las citoquinas inflamatorias IL-1β y TNFα en los receptores de médula del grupo con FRCV. Los macrófagos son los principales productores de estas citoquinas, que en el hígado, y de forma paracrina pueden tener efectos en el metabolismo[269]. El análisis subsiguiente mostró una mayor expresión de marcadores de macrófagos en el hígado de animales trasplantados con médula ósea de donantes con FRCV, que se correlacionaban directamente con una mayor expresión de los genes Lpl, Fabp4 y Cd36. Este hallazgo sugiere una relación entre la infiltración de células inflamatorias y el desequilibrio de la homeostasis lipídica en el hígado, observada en los animales que recibieron médula de donantes con FRCV.

En resumen, estos resultados sugieren que el trasplante de médula ósea de donantes que tengan una acumulación de FRCV puede inducir la migración y la activación de macrófagos pro-inflamatorios en el hígado de los receptores. La liberación de citoquinas pro-inflamatorias por parte de esas células puede producir cambios en genes relacionados con el metabolismo lipídico a través de la señalización FXR/RXR, y un aumento de LPL, que cataliza la hidrólisis de triglicéridos contenidos en lipoproteínas plasmáticas y puede inducir la captación y retención de lipoproteínas pro-aterogénicas[270,271].

Estos resultados pueden tener una gran relevancia a nivel clínico, ya que a pesar de que los mecanismos implicados son complejos y requieren investigaciones adicionales para ser comprendidos, sugieren que la presencia de FRCV en los donantes de médula ósea puede transferir un estado pro-inflamatorio e incrementar el riesgo cardiovascular de receptores sanos. Esto plantea la necesidad de analizar la presencia de FRCV en los donantes, así como realizar un seguimiento exhaustivo en los receptores, prestando especial atención a los procesos inflamatorios.

Por último, debido a las interesantes propiedades angiogénicas de las ASC y a la notable influencia que tiene sobre su fenotipo la presencia de FRCV, en esta tesis nos interesamos por el posible papel que éstas pueden tener en el desarrollo de la enfermedad aterosclerótica.

El tejido adiposo perivascular rodea directamente las arterias, sin ninguna capa que separe ambos tejidos, y está asociado con la presencia y la severidad de enfermedad aterosclerótica en las arterias coronarias[97,272]. Se ha observado que los segmentos de arteria coronaria que carecen de grasa perivascular están protegidos frente el desarrollo de aterosclerosis[95,96].

Aunque se ha propuesto un efecto paracrino pro-inflamatorio del tejido adiposo perivascular coronario como responsable de su supuesto papel pro-aterogénico[91,273], no debe desestimarse su contribución en procesos angiogénicos[274,275]. La inflamación y la nueva formación de microvasos inestables en la capa adventicia de las arterias coronarias contribuye a la neovascularización de las placas ateroscleróticas[276,277]. Además, estos nuevos microvasos desestructurados se asocian a hemorragias intraplaca que incrementan la vulnerabilidad de la placa aterosclerótica[278,279]. Estudios de

transcriptoma y secretoma muestran un enriquecimiento en vías relacionadas con la angiogénesis, y una mayor capacidad de secreción de estos productos, en la grasa perivascular en comparación con otros depósitos adiposos[280].

En esta tesis se han caracterizado por primera vez las ASC de tejido adiposo perivascular coronario humano, concretamente, las localizadas en torno a la arteria coronaria descendente anterior izquierda. En promedio, las ASC identificadas mediante triple marcaje representaron un 1% del total de células de la SVF, en línea con lo descrito en otras localizaciones adiposas[119]. Una vez en cultivo, y tras comprobar su identidad mediante el análisis de marcadores de superficie y la capacidad de diferenciación a los linajes mesodérmicos, se analizaron las características angiogénicas de esta población.

Las ASC en cultivo, sin ser sometidas a diferenciación endotelial mediante factores de crecimiento, expresaron los genes PECAM1, VEGFR1, VWF y, en mayor medida, VEGFR2, involucrado en la migración, supervivencia y formación de tubos en células endoteliales[281]. También fueron capaces de formar estructuras tubulares en matrigel, lo que puso de manifiesto su potencial pro-angiogénico. Sin embargo, uno de los hallazgos más destacables de esta caracterización fue la elevada expresión génica de TF en las ASC. Si bien es conocida su función trombogénica, TF participa también en mecanismos de señalización celular, migración y angiogénesis[282–284], y su elevada expresión sugiere una función biológica en las ASC.

Existen evidencias de que la proliferación y migración anormales de las células musculares lisas vasculares (VSMC) son la causa principal del engrosamiento de la capa íntima de las arterias[285,286]. Se ha demostrado que las ASC cooperan con las células endoteliales para formar redes tubulares in vitro, funcionando como pericitos[136,287]. Sin embargo, la interacción entre las ASC y las VSMC ha sido poco estudiada. Nuestros resultados demostraron que el co-cultivo de estas dos poblaciones da lugar a una interacción directa entre las ASC y las VSMC, que se organizan para formar una red de estructuras tubulares en la que ambas poblaciones resultan intercaladas y perfectamente integradas. La comunicación entre estas poblaciones no consistió únicamente en el contacto directo, ya que observamos un aumento de la proliferación en las VSMC cuando fueron tratadas con el secretoma de las ASC, en comparación con el medio no condicionado. Esta última observación coincide con los resultados de un

estudio previo, que describe que el medio condicionado de las ASC de tejido adiposo subcutáneo puede promover la proliferación de las VSMC, y que el efecto se suprime al inactivar el medio mediante calor[288].

La transformación fenotípica que experimentan las VSMC durante la progresión de la lesión aterosclerótica está estimulada por el microambiente local, incluida la secreción de citoquinas y factores de crecimiento[289]. Dado que existen evidencias de una conexión de la microvasculatura de la grasa perivascular y la pared de la arteria coronaria[86,89,290], es factible la posibilidad de que las ASC del tejido adiposo perivascular coronario participen en ese proceso.

A lo largo de esta tesis se ha demostrado que la presencia de FRCV tiene un impacto considerable en el fenotipo y función de las ASC. Las muestras de tejido adiposo perivascular coronario utilizadas en este estudio, se obtuvieron de corazones explantados a pacientes sometidos a un trasplante cardíaco. Se evaluó el efecto de la acumulación de FRCV comparando las ASC obtenidas de pacientes con una baja y alta presencia de FRCV. El grupo con una alta carga de FRCV se caracterizó por una predominancia de dislipemia y por la presencia de lesiones ateroscleróticas avanzadas. Aunque no se detectaron diferencias sustanciales en la habilidad de formar estructuras tubulares in vitro, las ASC de los pacientes con elevada acumulación de FRCV mostraron una expresión de TF elevada en comparación con el grupo menos afectado por FRCV. Los lípidos son estímulos potentes de la expresión de TF en células endoteliales y VSMC[291,292], lo que podría explicar en parte el aumento de su expresión en ASC. Se debe tener en cuenta que todos los pacientes dislipémicos a la espera de trasplante recibieron tratamiento hipolipemiante con estatinas, las cuales han demostrado reducir la expresión de TF[293,294]. A pesar del tratamiento, las ASC de grasa pericoronaria de estos pacientes mostraron una mayor expresión de TF.

En un ensayo de migración in vitro en co-cultivo, las ASC de pacientes con mayor acumulación de FRCV migraron más rápidamente hacia las VSMC, a la vez que expresaron altos niveles de TF en el frente de migración. Además, el secretoma de éstas indujo en mayor medida la proliferación de las VSMC. Teniendo en cuenta el potencial angiogénico de las ASC y su capacidad para formar estructuras tubulares en asociación con las VSMC, esto sugiere que las ASC podrían contribuir a promover la formación de nuevos vasos sanguíneos en

la zona peri-adventicia, así como el fenotipo "sintético" o proliferativo de las VSMC, en arterias coronarias de pacientes con elevada acumulación de FRCV.

Con el fin de analizar si la expresión de TF en las ASC guarda relación con la comunicación intercelular con las VSMC, se realizaron co-cultivos de estas poblaciones después de silenciar la expresión de TF en las ASC mediante transfección con siRNA. El silenciamiento ocasionó en las ASC una pérdida de la capacidad para organizarse en estructuras tubulares, así como de establecer interacciones célula-célula con las VSMC. Este resultado pone de manifiesto que la expresión de TF en las ASC juega un papel clave en la comunicación angiogénica con las VSMC.

Mediante análisis histológicos se detectó la expresión de TF en la adventicia de arterias coronarias con lesiones ateroscleróticas avanzadas, localizado cerca de microvasos, de acuerdo con lo observado por otros autores[295]. De hecho, el TF se expresa en las células endoteliales de los vasa vasorum y en la adventicia de los vasos sanos, pero no en el lumen arterial de estos. En las placas ateroscleróticas se observa expresión de TF en el endotelio de los microvasos intraplaca, pero no en el endotelio luminal. En nuestro estudio, en la zona adventicia/adiposo perivascular, y en línea con lo descrito previamente en otros vasos[120], se detectaron marcadores de ASC. Estudios previos de nuestro grupo han demostrado la relación entre TF y la angiogénesis intraplaca[296]. Los resultados aquí presentados sugieren, además, la participación de las ASC del tejido adiposo perivascular coronario en la producción de TF en las ASC, y la estimulación proliferativa y angiogénica de las VSMC. Esta actividad estaría potenciada en pacientes con una elevada acumulación de factores de riesgo y lesiones ateroscleróticas avanzadas, aunque nuestros resultados no nos permiten precisar todavía qué condiciones modifican el fenotipo de las ASC.

De forma similar a la mayoría de procesos biológicos, el modo en que la contribución de las ASC al progreso de la enfermedad aterosclerótica es positivo o negativo en términos clínicos, depende de un delicado balance. Si las ASC promueven de forma descontrolada la proliferación de las VSMC, secretan altos niveles de TF, y promueven la formación de microvasos de manera rápida pero inestable, contribuirán de manera perjudicial, favoreciendo el engrosamiento de la íntima y desencadenando episodios hemorrágicos que hagan la placa más vulnerable a la ruptura. Por el contrario, si la interacción de

las ASC con las VSMC y las células endoteliales da lugar a la formación y maduración de vasos estables, se evitará el estrés oxidativo y las cascadas inflamatorias derivadas de una oxigenación insuficiente.

Teniendo en cuenta la importancia de los procesos inflamatorios en torno al desarrollo de la placa aterosclerótica[297], sería interesante analizar, en futuras investigaciones, las modificaciones que la presencia de FRCV pueden haber ocasionado en las propiedades inmunomoduladoras de las ASC de tejido adiposo perivascular coronario. Estudios recientes, que han propuesto las ASC de tejido adiposo epicárdico como candidatas para su uso en terapia celular cardíaca[298], han descrito en estas células la capacidad de suprimir la proliferación de células T y de regular la secreción de citoquinas inflamatorias[127].

Este estudio tiene como principal limitación el reducido número de pacientes analizados, ya que para tener la posibilidad de obtener las arterias coronarias y el tejido adiposo perivascular que las rodea, la obtención de muestra queda limitada a corazones de un grupo de pacientes trasplantados. Además, las características de estos pacientes no corresponden a una fase aguda de la enfermedad, ya que en espera del trasplante, están tratados farmacológicamente siguiendo las guías clínicas. A excepción de las estatinas, ambos grupos de pacientes recibieron tratamientos similares que incluyen fármacos antitrombóticos, vasodilatadores, diuréticos y beta-bloqueantes.

En resumen, los resultados de esta tesis ponen de manifiesto que existen diferencias intrínsecas de las ASC residentes en los distintos depósitos de grasa, relacionadas con su potencial de diferenciación, y que ayudan a explicar la menor capacidad de expansión del tejido adiposo visceral. Por otro lado, demuestran que la presencia de FRCV tiene un impacto negativo en las propiedades angiogénicas de las ASC subcutáneas y epicárdicas. Esta disminución de la capacidad para estimular la formación de vasos limita el uso autólogo de estas células para tratar enfermedades de carácter isquémico, pero también podría ser una de las causas de los problemas vasculares asociados a importantes FRCV, como la disfunción endotelial en pacientes hipertensos o las complicaciones microvasculares en pacientes diabéticos. La vía de señalización Notch se ha revelado, en todos los casos, como un mecanismo clave en la regulación del potencial de diferenciación de

las ASC, mediante el cual las modificaciones patológicas producidas por la acumulación de FRCV tienen un impacto sobre la funcionalidad de las ASC de las distintas localizaciones adiposas.

Adicionalmente, se ha observado que la médula ósea de donantes con FRCV incrementa el riesgo cardiovascular de los receptores, lo que plantea la necesidad de contemplar las características de los donantes.

Finalmente, en esta tesis se han descrito por primera vez las características fenotípicas y funcionales de las ASC derivadas del tejido adiposo perivascular coronario humano. Aunque es necesaria una investigación más profunda en el tema, nuestros resultados muestran una comunicación activa entre ASC y VSMC, en un proceso mediado por la expresión de TF en las ASC. Este hallazgo, junto con la observación de altos niveles de expresión de TF en las ASC de pacientes con acumulación de FRCV, abre un nuevo enfoque en la investigación sobre los procesos angiogénicos que se desarrollan en torno a la placa aterosclerótica de las arterias coronarias.

CONCLUSIONES

A partir de los resultados presentados en esta tesis se han obtenido las siguientes conclusiones:

- Las ASC residentes en tejidos adiposos viscerales presentan diferencias intrínsecas respecto a las de tejido adiposo subcutáneo en cuanto a la expresión génica de elementos reguladores de la multipotencia y la determinación celular.

- La activación de la vía de señalización Notch limita el potencial adipogénico de las ASC residentes en tejidos adiposos viscerales.

- Las diferencias observadas en el perfil transcriptómico y la capacidad de diferenciación adipogénica de las ASC del tejido adiposo subcutáneo y visceral se acentúan en presencia de factores de riesgo cardiovascular.

- La acumulación de factores de riesgo cardiovascular reduce la expresión de genes característicos de células madre mesenquimales en el tejido adiposo subcutáneo.

- La capacidad multipotente de las ASC de tejido adiposo subcutáneo y su potencial angiogénico se ven reducidos por la presencia de factores de riesgo cardiovascular.

- La acumulación de factores de riesgo cardiovascular reduce el número de ASC y la expresión de genes de multipotencia en la fracción vascular del estroma del tejido adiposo epicárdico.

- La acumulación de factores de riesgo cardiovascular reduce el potencial angiogénico de las ASC de tejido adiposo epicárdico mediante la activación de la vía de señalización Notch.

- El trasplante de médula ósea de donantes con acumulación de factores de riesgo cardiovascular transfiere un fenotipo pro-inflamatorio y aumenta el riesgo cardiovascular en receptores sanos.

- Las ASC de tejido adiposo perivascular coronario se organizan con las VSMC para formar estructuras tubulares en un proceso en el que es imprescindible la expresión de TF en las ASC.

- En la capa adventicia de arterias coronarias humanas con lesión aterosclerótica avanzada co-localizan marcadores de microvasculatura, TF y ASC.
- Las ASC de tejido adiposo perivascular coronario de pacientes con mayor acumulación de factores de riesgo cardiovascular y lesiones ateroscleróticas avanzadas presentan una mayor migración hacia las VSMC y estimulan de forma más potente su proliferación.

En resumen, las conclusiones generales extraídas de esta tesis doctoral son las siguientes:

1. **Las ASC presentan distintas características fenotípicas y funcionales en función del tejido adiposo del que provienen.**
2. **La vía de señalización Notch tiene un papel importante en la regulación del potencial de diferenciación de las ASC, y podría estudiarse su uso como diana terapéutica o estrategia de condicionamiento.**
3. **En terapia regenerativa, es desaconsejable el uso de células madre de donantes que presenten una acumulación de factores de riesgo cardiovascular, por su reducido potencial regenerativo y la posibilidad de incrementar el riesgo cardiovascular en el receptor.**
4. **Las ASC de tejido adiposo perivascular coronario interaccionan de forma directa y paracrina con las VSMC, en un proceso en el que participa la expresión de *Tissue factor* en las ASC.**

BIBLIOGRAFÍA

1. WHO | Cardiovascular diseases (CVDs). *WHO* (2016).

2. INE (Instituto Nacional de Estadística) (2016) [Base de datos en línea]. Available at: http://www.ine.es/dynt3/inebase/es/index.htm?padre=2645&capsel=2649. (Accessed: 4th August 2016)

3. Cannon, B. Cardiovascular disease: Biochemistry to behaviour. *Nature* **493,** S2–S3 (2013).

4. Ibanez, B., Vilahur, G. & Badimon, J. J. Plaque progression and regression in atherothrombosis. *J. Thromb. Haemost.* **5 Suppl 1,** 292–9 (2007).

5. Insull, W. The pathology of atherosclerosis: plaque development and plaque responses to medical treatment. *Am. J. Med.* **122,** S3–S14 (2009).

6. Fernández-Ortiz, A. *et al.* Characterization of the relative thrombogenicity of atherosclerotic plaque components: implications for consequences of plaque rupture. *J. Am. Coll. Cardiol.* **23,** 1562–9 (1994).

7. Badimon, J. J., Fuster, V., Chesebro, J. H. & Badimon, L. Coronary atherosclerosis. A multifactorial disease. *Circulation* **87,** II3-16 (1993).

8. Badimon, L., Badimon, J. J., Vilahur, G., Segalés, E. & Llorente, V. Pathogenesis of the acute coronary syndromes and therapeutic implications. *Pathophysiol. Haemost. Thromb.* **32,** 225–31 (2002).

9. Fuster, V., Badimon, L., Badimon, J. J. & Chesebro, J. H. The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes (1). *N. Engl. J. Med.* **326,** 242–50 (1992).

10. Kinlay, S., Libby, P. & Ganz, P. Endothelial function and coronary artery disease. *Curr. Opin. Lipidol.* **12,** 383–9 (2001).

11. Ross, R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N. Engl. J. Med.* **340,** 115–26 (1999).

12. Bürrig, K. F. The endothelium of advanced arteriosclerotic plaques in humans. *Arterioscler. Thromb.* **11,** 1678–89 (1991).

13. Fuster, V. Lewis A. Conner Memorial Lecture. Mechanisms leading to myocardial infarction: insights from studies of vascular biology. *Circulation* **90,** 2126–46 (1994).

14. Bentzon, J. F., Otsuka, F., Virmani, R. & Falk, E. Mechanisms of plaque formation and rupture. *Circ. Res.* **114,** 1852–66 (2014).

15. Hellström, M. *et al.* Lack of pericytes leads to endothelial hyperplasia and abnormal vascular morphogenesis. *J. Cell Biol.* **153,** 543–53 (2001).

16. Chung, A. S. & Ferrara, N. Developmental and Pathological Angiogenesis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **27,** 563–584 (2011).

17. Kolodgie, F. D. *et al.* Intraplaque Hemorrhage and Progression of Coronary Atheroma. *N. Engl. J. Med.* **349,** 2316–2325 (2003).

18. Virmani, R. *et al.* Atherosclerotic plaque progression and vulnerability to rupture: angiogenesis as a source of intraplaque hemorrhage. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **25,** 2054–61 (2005).

19. Jain, R. K., Finn, A. V, Kolodgie, F. D., Gold, H. K. & Virmani, R. Antiangiogenic therapy for normalization of atherosclerotic plaque vasculature: a potential strategy for plaque

stabilization. *Nat. Clin. Pract. Cardiovasc. Med.* **4,** 491–502 (2007).

20. Wilson, P. W. *et al.* Prediction of coronary heart disease using risk factor categories. *Circulation* **97,** 1837–47 (1998).

21. Kessler, T., Vilne, B. & Schunkert, H. The impact of genome-wide association studies on the pathophysiology and therapy of cardiovascular disease. *EMBO Mol. Med.* **8,** 688–701 (2016).

22. Leander, K., Hallqvist, J., Reuterwall, C., Ahlbom, A. & de Faire, U. Family history of coronary heart disease, a strong risk factor for myocardial infarction interacting with other cardiovascular risk factors: results from the Stockholm Heart Epidemiology Program (SHEEP). *Epidemiology* **12,** 215–21 (2001).

23. Vaccarino, V. *et al.* Ischaemic heart disease in women: are there sex differences in pathophysiology and risk factors? Position paper from the working group on coronary pathophysiology and microcirculation of the European Society of Cardiology. *Cardiovasc. Res.* **90,** 9–17 (2011).

24. Traylor, M. *et al.* Differences in Common Genetic Predisposition to Ischemic Stroke by Age and Sex. *Stroke.* **46,** 3042–7 (2015).

25. Appelros, P., Stegmayr, B. & Terént, A. Sex differences in stroke epidemiology: a systematic review. *Stroke.* **40,** 1082–90 (2009).

26. Leone, A. Relationship between cigarette smoking and other coronary risk factors in atherosclerosis: risk of cardiovascular disease and preventive measures. *Curr. Pharm. Des.* **9,** 2417–23 (2003).

27. Morris, P. B. *et al.* Cardiovascular Effects of Exposure to Cigarette Smoke and Electronic Cigarettes: Clinical Perspectives From the Prevention of Cardiovascular Disease Section Leadership Council and Early Career Councils of the American College of Cardiology. *J. Am. Coll. Cardiol.* **66,** 1378–1391 (2015).

28. Lucas, D. L., Brown, R. A., Wassef, M. & Giles, T. D. Alcohol and the Cardiovascular System: Research Challenges and Opportunities. *J. Am. Coll. Cardiol.* **45,** 1916–1924 (2005).

29. Katsiki, N., Tziomalos, K. & Mikhailidis, D. P. Alcohol and the cardiovascular system: a double-edged sword. *Curr. Pharm. Des.* **20,** 6276–88 (2014).

30. Forbes, J. M. *et al.* Mechanisms of diabetic complications. *Physiol. Rev.* **93,** 137–88 (2013).

31. Diabetes mellitus: a major risk factor for cardiovascular disease. *Circulation* **100,** 1132–3 (1999).

32. Battiprolu, P. K. *et al.* Diabetic cardiomyopathy and metabolic remodeling of the heart. *Life Sci.* **92,** 609–615 (2013).

33. Alonso Karlezi, R. A., Mata Pariente, N. & Mata López, P. Control de las hiperlipemias en la práctica clínica. *Rev. Española Cardiol.* **6,** 24–35 (2006).

34. National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation* **106,** 3143–421 (2002).

35. Miller, M. Dyslipidemia and cardiovascular risk: the importance of early prevention. *QJM* **102,** 657–67 (2009).

36. OMS | Preguntas y respuestas sobre la hipertensión. *WHO* (2016).

37. Rapsomaniki, E. *et al.* Blood pressure and incidence of twelve cardiovascular diseases: lifetime risks, healthy life-years lost, and age-specifi c associations in 1·25 million people. *Lancet* **383,** 1899–1911 (2014).

38. Angeli, F., Reboldi, G. & Verdecchia, P. Hypertension, inflammation and atrial fibrillation. *J. Hypertens.* **32,** 480–483 (2014).

39. Lloyd-Jones, D. M., Leip, E. P., Larson, M. G., Vasan, R. S. & Levy, D. Novel approach to examining first cardiovascular events after hypertension onset. *Hypertens. (Dallas, Tex. 1979)* **45,** 39–45 (2005).

40. Poirier, P. *et al.* Obesity and Cardiovascular Disease: Pathophysiology, Evaluation, and Effect of Weight Loss. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **26,** 968–976 (2006).

41. Lavie, C. J., Milani, R. V & Ventura, H. O. Obesity and Cardiovascular Disease: Risk Factor, Paradox, and Impact of Weight Loss. *J Am Colll Cardiol* **53,** 1925–32 (2009).

42. Kesaniemi, Y. K. *et al.* Dose-response issues concerning physical activity and health: an evidence-based symposium. *Med. Sci. Sports Exerc.* **33,** S351-8 (2001).

43. León-Latre, M. *et al.* Sedentarismo y su relación con el perfil de riesgo cardiovascular, la resistencia a la insulina y la inflamación. *Rev. Española Cardiol.* **67,** 449–455 (2014).

44. Rosengren, A. *et al.* Association of psychosocial risk factors with risk of acute myocardial infarction in 11119 cases and 13648 controls from 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. *Lancet (London, England)* **364,** 953–62 (1993).

45. Kaukua, J., Turpeinen, A., Uusitupa, M. & Niskanen, L. Clustering of cardiovascular risk factors in type 2 diabetes mellitus: prognostic significance and tracking. *Diabetes, Obes. Metab.* **3,** 17–23 (2001).

46. Eckel, R. H., Grundy, S. M. & Zimmet, P. Z. The metabolic syndrome. *Lancet (London, England)* **365,** 1415–28 (2005).

47. Stamler, J., Vaccaro, O., Neaton, J. D. & Wentworth, D. Diabetes, other risk factors, and 12-yr cardiovascular mortality for men screened in the Multiple Risk Factor Intervention Trial. *Diabetes Care* **16,** 434–44 (1993).

48. GROUP, E. R. Prediction of coronary heart disease in Europe The 2nd report of the WHO-ERICAProject. *Eur. Heart J.* **12,** 291–297 (1991).

49. Leaverton, P. E. *et al.* Representativeness of the Framingham risk model for coronary heart disease mortality: a comparison with a national cohort study. *J. Chronic Dis.* **40,** 775–84 (1987).

50. Willett, W. C. Balancing life-style and genomics research for disease prevention. *Science* **296,** 695–8 (2002).

51. Brotons, C. *et al.* Adaptación Española de la guía europea de prevención cardiovascular. *Rev Esp Salud Pública* **78,** 435–438 (2004).

52. Piepoli, M. F. *et al.* 2016 European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice. *Eur. Heart J.* **37,** 2315–2381 (2016).

53. Sans, S., Fitzgerald, A. P., Royo, D., Conroy, R. & Graham, I. Calibración de la tabla SCORE de riesgo cardiovascular para España. *Rev. Española Cardiol.* **60,** 476–485 (2007).

54. Passweg, J. R. *et al.* Hematopoietic SCT in Europe: data and trends in 2012 with special consideration of pediatric transplantation. *Bone Marrow Transplant.* **49,** 744–50 (2014).

55. Armenian, S. H. & Chow, E. J. Cardiovascular disease in survivors of hematopoietic cell transplantation. *Cancer* **120,** 469–79 (2014).

56. Sun, C.-L. *et al.* Prevalence and predictors of chronic health conditions after hematopoietic cell transplantation: a report from the Bone Marrow Transplant Survivor Study. *Blood* **116,** 3129–39; quiz 3377 (2010).

57. Annaloro, C. *et al.* Prevalence of metabolic syndrome in long-term survivors of hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* **41,** 797–804 (2008).

58. Baker, K. S. *et al.* Diabetes, hypertension, and cardiovascular events in survivors of hematopoietic cell transplantation: a report from the bone marrow transplantation survivor study. *Blood* **109,** 1765–72 (2007).

59. Armenian, S. H. *et al.* Cardiovascular risk factors in hematopoietic cell transplantation survivors: role in development of subsequent cardiovascular disease. *Blood* **120,** 4505–12 (2012).

60. Majhail, N. S. *et al.* High prevalence of metabolic syndrome after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* **43,** 49–54 (2009).

61. Taskinen, M. *et al.* Impaired glucose tolerance and dyslipidaemia as late effects after bone-marrow transplantation in childhood. *Lancet* **356,** 993–997 (2000).

62. International Diabetes Federation. International Diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas, 7th edition. (2015).

63. International Diabetes Federation. International Diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas, 5th edition. (2011).

64. WHO | Diabetes programme. *WHO* (2016).

65. Alberti, K. G. M. M. & Zimmet, P. Z. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus. Provisional report of a WHO Consultation. *Diabet. Med.* **15,** 539–553 (1998).

66. Roep, B. O. & Tree, T. I. M. Immune modulation in humans: implications for type 1 diabetes mellitus. *Nat. Rev. Endocrinol.* **10,** 229–242 (2014).

67. American Diabetes Association, A. D. *et al.* Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* **37 Suppl 1,** S81-90 (2014).

68. Woodard, H. Q. & White, D. R. The composition of body tissues. *Br. J. Radiol.* **59,** 1209–1218 (1986).

69. Lelliott, C. & Vidal-Puig, A. J. Lipotoxicity, an imbalance between lipogenesis de novo and fatty acid oxidation. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* **28 Suppl 4,** S22-8 (2004).

70. Scherer, P. E. Adipose tissue: from lipid storage compartment to endocrine organ. *Diabetes* **55,** 1537–45 (2006).

71. Boon, M. R. & van Marken Lichtenbelt, W. D. in *Metabolic control* 301–319 (Springer International Publishing, 2015).

72. Hassan, M., Latif, N. & Yacoub, M. Adipose tissue: friend or foe? *Nat. Rev. Cardiol.* **9,** 689–702 (2012).

73. Cannon, B. & Nedergaard, J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol. Rev.* **84,** 277–359 (2004).

74. Trayhurn, P. Adipocyte biology. *Obes. Rev.* **8,** 41–44 (2007).

75. Langin, D., Frühbeck, G., Frayn, K. N. & Lafontan, M. in *Obesity* 79–108 (John Wiley & Sons, Ltd, 2009).

76. Serrano Rios, M., Gutiérrez Fuentes, J. A., Ordovas, J. M. & Fundación Lilly. in *Obesity* (Elsevier, 2010).

77. 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.* **292,** E298-307 (2007).

78. Britton, K. A. *et al.* Ectopic fat depots and cardiovascular disease. *Circulation* **124,** e837-41 (2011).

79. Tran, T. T., Yamamoto, Y., Gesta, S. & Kahn, C. R. Beneficial effects of subcutaneous fat transplantation on metabolism. *Cell Metab.* **7,** 410–20 (2008).

80. Tchernof, A. & Després, J.-P. Pathophysiology of human visceral obesity: an update. *Physiol. Rev.* **93,** 359–404 (2013).

81. Kabir, M. *et al.* Molecular evidence supporting the portal theory: a causative link between visceral adiposity and hepatic insulin resistance. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **288,** E454-61 (2005).

82. 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.* **288,** E267-77 (2005).

83. Joe, A. W. B., Yi, L., Even, Y., Vogl, A. W. & Rossi, F. M. V. Depot-specific differences in adipogenic progenitor abundance and proliferative response to high-fat diet. *Stem Cells* **27,** 2563–70 (2009).

84. Spalding, K. L. *et al.* Dynamics of fat cell turnover in humans. *Nature* **453,** 783–7 (2008).

85. Siegel-Axel, D. I. & Häring, H. U. Perivascular adipose tissue: An unique fat compartment relevant for the cardiometabolic syndrome. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* **17,** 51–60 (2016).

86. Iacobellis, G., Corradi, D. & Sharma, A. M. Epicardial adipose tissue: anatomic, biomolecular and clinical relationships with the heart. *Nat. Clin. Pract. Cardiovasc. Med.* **2,** 536–43 (2005).

87. Marchington, J. M. & Pond, C. M. 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.* **14,** 1013–22 (1990).

88. Pezeshkian, M. *et al.* Fatty acid composition of epicardial and subcutaneous human adipose tissue. *Metab. Syndr. Relat. Disord.* **7,** 125–31 (2009).

89. Iacobellis, G. Local and systemic effects of the multifaceted epicardial adipose tissue depot. *Nat. Rev. Endocrinol.* **11,** 363–71 (2015).

90. Yu-Jing Gao, B. S. P. Dual Modulation of Vascular Function by Perivascular Adipose Tissue and Its Potential Correlation with Adiposity/Lipoatrophy-Related Vascular Dysfunction. *Curr. Pharm. Des.* **13,** 2185–92 (2007).

91. Chatterjee, T. K. *et al.* Proinflammatory phenotype of perivascular adipocytes: influence of high-fat feeding. *Circ. Res.* **104,** 541–9 (2009).

92. Pierdomenico, S. D., Pierdomenico, A. M., Cuccurullo, F. & Iacobellis, G. Meta-analysis of the relation of echocardiographic epicardial adipose tissue thickness and the metabolic syndrome. *Am. J. Cardiol.* **111,** 73–8 (2013).

93. Iacobellis, G. *et al.* Echocardiographic epicardial adipose tissue is related to anthropometric and clinical parameters of metabolic syndrome: a new indicator of cardiovascular risk. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **88,** 5163–8 (2003).

94. Iacobellis, G. & Leonetti, F. Epicardial Adipose Tissue and Insulin Resistance in Obese Subjects. **90,** 6300–2 (2005).

95. Ishii, T., Asuwa, N., Masuda, S. & Ishikawa, Y. The effects of a myocardial bridge on coronary atherosclerosis and ischaemia. *J. Pathol.* **185,** 4–9 (1998).

96. Ishikawa, Y. *et al.* Significance of anatomical properties of myocardial bridge on atherosclerosis evolution in the left anterior descending coronary artery. *Atherosclerosis* **186,** 380–389 (2006).

97. Greif, M. *et al.* Pericardial adipose tissue determined by dual source CT is a risk factor for coronary atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **29,** 781–6 (2009).

98. Sade, L. E. *et al.* Relation between epicardial fat thickness and coronary flow reserve in women with chest pain and angiographically normal coronary arteries. *Atherosclerosis* **204,** 580–585 (2009).

99. Iacobellis, G., Lonn, E., Lamy, A., Singh, N. & Sharma, A. M. *Epicardial fat thickness and coronary artery disease correlate independently of obesity*. *International Journal of Cardiology* **146,** (2011).

100. Mahabadi, A. A. *et al.* Association of Epicardial Fat With Cardiovascular Risk Factors and Incident Myocardial Infarction in the General Population: The Heinz Nixdorf Recall Study. *J. Am. Coll. Cardiol.* **61,** 1388–1395 (2013).

101. Duplus, E., Glorian, M. & Forest, C. Fatty acid regulation of gene transcription. *J. Biol. Chem.* **275,** 30749–52 (2000).

102. Sheehan, M. T. & Jensen, M. D. Metabolic complications of obesity. Pathophysiologic considerations. *Med. Clin. North Am.* **84,** 363–85, vi (2000).

103. Shepherd, P. R. *et al.* Adipose cell hyperplasia and enhanced glucose disposal in transgenic mice overexpressing GLUT4 selectively in adipose tissue. *J. Biol. Chem.* **268,** 22243–6 (1993).

104. Ibrahim, M. M. Subcutaneous and visceral adipose tissue: structural and functional differences. *Obes. Rev.* **11,** 11–8 (2010).

105. Rutkowski, J. M., Davis, K. E. & Scherer, P. E. Mechanisms of obesity and related pathologies: the macro- and microcirculation of adipose tissue. *FEBS J.* **276,** 5738–46 (2009).

106. Schipper, H. S., Prakken, B., Kalkhoven, E. & Boes, M. Adipose tissue-resident immune

cells: key players in immunometabolism. *Trends Endocrinol. Metab.* **23,** 407–15 (2012).

107. Esteve Ràfols, M. Tejido adiposo: heterogeneidad celular y diversidad funcional. *Endocrinol. y Nutr.* **61,** 100–112 (2014).

108. Blüher, M. *et al.* Adipose tissue dysfunction contributes to obesity related metabolic diseases. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* **27,** 163–177 (2013).

109. Rezaee, F. & Dashty, M. Role of Adipose Tissue in Metabolic System Disorders - Adipose Tissue is the Initiator of Metabolic Diseases. *J. Diabetes Metab.* **1,** 8 (2013).

110. Cottam, D. R. *et al.* The chronic inflammatory hypothesis for the morbidity associated with morbid obesity: implications and effects of weight loss. *Obes. Surg.* **14,** 589–600 (2004).

111. Odegaard, J. & Chawla, A. Leukocyte set points in metabolic disease. *F1000 Biol. Rep.* **4,** (2012).

112. Kao, A. H., Sabatine, J. M. & Manzi, S. Update on vascular disease in systemic lupus erythematosus. *Curr. Opin. Rheumatol.* **15,** 519–27 (2003).

113. Rupprecht, H. J. *et al.* Impact of viral and bacterial infectious burden on long-term prognosis in patients with coronary artery disease. *Circulation* **104,** 25–31 (2001).

114. Uccelli, A., Moretta, L. & Pistoia, V. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* **8,** 726–736 (2008).

115. Shi, Y. *et al.* Mesenchymal stem cells: a new strategy for immunosuppression and tissue repair. *Cell Res.* **20,** 510–8 (2010).

116. Zuk, P. A. *et al.* Multilineage Cells from Human Adipose Tissue: Implications for Cell-Based Therapies. *Tissue Eng.* **7,** 211–228 (2001).

117. Gimble, J. M., Katz, A. J. & Bunnell, B. A. Adipose-Derived Stem Cells for Regenerative Medicine. *Circ. Res.Circ Res* **100,** 1249–60 (2007).

118. Naveiras, O. & Daley, G. Q. Stem cells and their niche: a matter of fate. *Cell. Mol. Life Sci.* **63,** 760–6 (2006).

119. Baer, P. C. & Geiger, H. Adipose-derived mesenchymal stromal/stem cells: Tissue localization, characterization, and heterogeneity. **2012,** 1–11 (2012).

120. Corselli, M. *et al.* The tunica adventitia of human arteries and veins as a source of mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev.* **21,** 1299–308 (2012).

121. Lin, G. *et al.* Defining stem and progenitor cells within adipose tissue. *Stem Cells Dev.* **17,** 1053–63 (2008).

122. Baer, P. C. Adipose-derived mesenchymal stromal/stem cells: An update on their phenotype in vivo and in vitro. *World J. Stem Cells* **6,** 256–65 (2014).

123. Bourin, P. *et al.* Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the IFATS and the ISCT. *Cytotherapy* **15,** 641–648 (2013).

124. Cawthorn, W. P., Scheller, E. L. & MacDougald, O. A. Adipose tissue stem cells meet preadipocyte commitment: going back to the future. *J. Lipid Res.* **53,** 227–246 (2012).

125. Cui, L. *et al.* Expanded adipose-derived stem cells suppress mixed lymphocyte reaction by secretion of prostaglandin E2. *Tissue Eng.* **13,** 1185–95 (2007).

126. Crop, M. J. *et al.* Inflammatory conditions affect gene expression and function of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Clin. Exp. Immunol.* **162,** 474–86 (2010).

127. Perea-Gil, I. *et al.* Preclinical evaluation of the immunomodulatory properties of cardiac adipose tissue progenitor cells using umbilical cord blood mesenchymal stem cells: a direct comparative study. *Biomed Res. Int.* **2015,** ID 439808 (2015).

128. Gonzalez-Rey, E. *et al.* Human adipose-derived mesenchymal stem cells reduce inflammatory and T cell responses and induce regulatory T cells in vitro in rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* **69,** 241–248 (2010).

129. Crop, M. J. *et al.* Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells induce explosive T-cell proliferation. *Stem Cells Dev.* **19,** 1843–53 (2010).

130. Leto Barone, A. A. *et al.* Immunomodulatory Effects of Adipose-Derived Stem Cells: Fact or Fiction? *Biomed Res. Int.* **2013,** 1–8 (2013).

131. Planat-Benard, V. *et al.* Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives. *Circulation* **109,** 656–63 (2004).

132. Cao, Y. *et al.* Human adipose tissue-derived stem cells differentiate into endothelial cells in vitro and improve postnatal neovascularization in vivo. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **332,** 370–9 (2005).

133. Rehman, J. *et al.* Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. *Circulation* **109,** 1292–8 (2004).

134. Kilroy, G. E. *et al.* Cytokine profile of human adipose-derived stem cells: expression of angiogenic, hematopoietic, and pro-inflammatory factors. *J. Cell. Physiol.* **212,** 702–9 (2007).

135. Matsuda, K. *et al.* Adipose-derived stem cells promote angiogenesis and tissue formation for in vivo tissue engineering. *Tissue Eng. Part A* **19,** 1327–35 (2013).

136. Merfeld-Clauss, S., Gollahalli, N., March, K. L. & Traktuev, D. O. Adipose tissue progenitor cells directly interact with endothelial cells to induce vascular network formation. *Tissue Eng. Part A* **16,** 2953–66 (2010).

137. Merfeld-Clauss, S. *et al.* Adipose Stromal Cells Differentiate Along a Smooth Muscle Lineage Pathway Upon Endothelial Cell Contact via Induction of Activin A. *Circ. Res.* **115,** 800–809 (2014).

138. Rohringer, S. *et al.* Mechanisms of vasculogenesis in 3D fibrin matrices mediated by the interaction of adipose-derived stem cells and endothelial cells. *Angiogenesis* **17,** 921–933 (2014).

139. Smart, N. & Riley, P. R. The stem cell movement. *Circ. Res.* **102,** 1155–68 (2008).

140. Gimble, J. M., Bunnell, B. A. & Guilak, F. Human adipose-derived cells: an update on the transition to clinical translation. *Regen. Med.* **7,** 225–35 (2012).

141. ClinicalTrials.gov. (2016). Available at: https://clinicaltrials.gov.

142. Bersenev, A. *Cell therapy clinical trials - 2014 report. CellTrials blog* (2015).

143. Pittenger, M. F. & Martin, B. J. Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics. *Circ. Res.* **95,** 9–20 (2004).

144. De Francesco, F., Ricci, G., D'Andrea, F., Nicoletti, G. F. & Ferraro, G. A. Human Adipose

Stem Cells: From Bench to Bedside. *Tissue Eng. Part B. Rev.* **21,** 572–84 (2015).

145. Van Harmelen, V., Röhrig, K. & Hauner, H. Comparison of proliferation and differentiation capacity of human adipocyte precursor cells from the omental and subcutaneous adipose tissue depot of obese subjects. *Metabolism.* **53,** 632–7 (2004).

146. Gesta, S. *et al.* Evidence for a role of developmental genes in the origin of obesity and body fat distribution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103,** 6676–81 (2006).

147. Perrini, S. *et al.* Fat depot-related differences in gene expression, adiponectin secretion, and insulin action and signalling in human adipocytes differentiated in vitro from precursor stromal cells. *Diabetologia* **51,** 155–164 (2008).

148. Khan, M., Akhtar, S., Mohsin, S., N Khan, S. & Riazuddin, S. Growth factor preconditioning increases the function of diabetes-impaired mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev.* **20,** 67–75 (2011).

149. Zaim, M., Karaman, S., Cetin, G. & Isik, S. Donor age and long-term culture affect differentiation and proliferation of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Ann. Hematol.* **91,** 1175–86 (2012).

150. Zhu, M. *et al.* The effect of age on osteogenic, adipogenic and proliferative potential of female adipose-derived stem cells. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **3,** 290–301 (2009).

151. Madonna, R. *et al.* Age-dependent impairment of number and angiogenic potential of adipose tissue-derived progenitor cells. *Eur. J. Clin. Invest.* **41,** 126–33 (2011).

152. MacEneaney, O. J. *et al.* Endothelial progenitor cell number and colony-forming capacity in overweight and obese adults. *Int. J. Obes. (Lond).* **33,** 219–25 (2009).

153. Friedl, G., Windhager, R., Schmidt, H. & Aigner, R. The osteogenic response of undifferentiated human mesenchymal stem cells (hMSCs) to mechanical strain is inversely related to body mass index of the donor. *Acta Orthop.* **80,** 491–8 (2009).

154. van Harmelen, V. *et al.* Effect of BMI and age on adipose tissue cellularity and differentiation capacity in women. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* **27,** 889–95 (2003).

155. Artavanis-Tsakonas, S., Rand, M. D. & Lake, R. J. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science* **284,** 770–6 (1999).

156. Osborne, B. A. & Minter, L. M. Notch signalling during peripheral T-cell activation and differentiation. *Nat. Rev. Immunol.* **7,** 64–75 (2007).

157. Andersson, E. R. & Lendahl, U. Therapeutic modulation of Notch signalling — are we there yet? *Nat. Publ. Gr.* **13,** 357–78 (2014).

158. Kingham, P. J., Mantovani, C. & Terenghi, G. Notch independent signalling mediates Schwann cell-like differentiation of adipose derived stem cells. *Neurosci. Lett.* **467,** 164–8 (2009).

159. Huang, Y. *et al.* γ-secretase inhibitor induces adipogenesis of adipose-derived stem cells by regulation of Notch and PPAR-γ. *Cell Prolif.* **43,** 147–156 (2010).

160. Jing, W. *et al.* Effects of gamma-secretase inhibition on the proliferation and vitamin D(3) induced osteogenesis in adipose derived stem cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **392,** 442–7 (2010).

161. Osathanon, T., Subbalekha, K., Sastravaha, P. & Pavasant, P. Notch signalling inhibits the adipogenic differentiation of single-cell-derived mesenchymal stem cell clones isolated

from human adipose tissue. *Cell Biol. Int.* **36,** 1161–70 (2012).

162. Kim, S. & Moustaid-Moussa, N. Secretory, endocrine and autocrine/paracrine function of the adipocyte. *J. Nutr.* **130,** 3110S–3115S (2000).

163. Northcott, J. M., Yeganeh, A., Taylor, C. G., Zahradka, P. & Wigle, J. T. Adipokines and the cardiovascular system: mechanisms mediating health and disease. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **90,** 1029–59 (2012).

164. Gastaldelli, A. & Basta, G. Ectopic fat and cardiovascular disease: what is the link? *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* **20,** 481–90 (2010).

165. Zucker, L. M. & Zucker, T. F. Fatty, a new mutation in the rat. *J. Hered.* **52,** 275–278 (1961).

166. Chua, S. C. *et al.* Phenotype of fatty due to Gln269Pro mutation in the leptin receptor (Lepr). *Diabetes* **45,** 1141–3 (1996).

167. Russell, J. C. & Proctor, S. D. Small animal models of cardiovascular disease: tools for the study of the roles of metabolic syndrome, dyslipidemia, and atherosclerosis. *Cardiovasc. Pathol.* **15,** 318–330 (2006).

168. Srinivasan, K. & Ramarao, P. Animal models in type 2 diabetes research: an overview. *Indian J. Med. Res.* **125,** 451–72 (2007).

169. Aleixandre de Artiñano, A. & Miguel Castro, M. Experimental rat models to study the metabolic syndrome. *Br. J. Nutr.* **102,** 1246–1253 (2009).

170. Nilsson, C., Raun, K., Yan, F., Larsen, M. O. & Tang-Christensen, M. Laboratory animals as surrogate models of human obesity. *Acta Pharmacol. Sin.* **33,** 173–81 (2012).

171. Tokuyama, Y. *et al.* Evolution of beta-cell dysfunction in the male Zucker diabetic fatty rat. *Diabetes* **44,** 1447–57 (1995).

172. King, A. J. F. The use of animal models in diabetes research. *Br. J. Pharmacol.* **166,** 877–94 (2012).

173. Clark, J. B., Palmer, C. J. & Shaw, W. N. The diabetic Zucker fatty rat. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **173,** 68–75 (1983).

174. Masiello, P. *et al.* Experimental NIDDM: development of a new model in adult rats administered streptozotocin and nicotinamide. *Diabetes* **47,** 224–9 (1998).

175. Animals, N. R. C. (US) C. for the U. of the G. for the C. and U. of L. *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (National Academies Press (US), 2011).

176. Berry, D. C. *et al.* The developmental origins of adipose tissue. *Development* **140,** 3939–49 (2013).

177. World Medical Association. World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects. *JAMA* **310,** 2191–4 (2013).

178. 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. *Circulation* **92,** 1355–74 (1995).

179. Sullivan, M., Galea, P. & Latif, S. What is the appropriate oxygen tension for in vitro

culture? *Mol. Hum. Reprod.* **12,** 653 (2006).

180. Carreau, A., El Hafny-Rahbi, B., Matejuk, A., Grillon, C. & Kieda, C. Why is the partial oxygen pressure of human tissues a crucial parameter? Small molecules and hypoxia. *J. Cell. Mol. Med.* **15,** 1239–53 (2011).

181. Oñate, B. *et al.* The subcutaneous adipose tissue reservoir of functionally active stem cells is reduced in obese patients. *FASEB J.* **26,** 4327–36 (2012).

182. Potier, E. *et al.* Hypoxia affects mesenchymal stromal cell osteogenic differentiation and angiogenic factor expression. *Bone* **40,** 1078–87 (2007).

183. Rosová, I., Dao, M., Capoccia, B., Link, D. & Nolta, J. A. Hypoxic preconditioning results in increased motility and improved therapeutic potential of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells* **26,** 2173–82 (2008).

184. Varela, O., Martínez-González, J. & Badimon, L. The response of smooth muscle cells to alpha-thrombin depends on its arterial origin: comparison among different species. *Eur. J. Clin. Invest.* **28,** 313–23 (1998).

185. Li, P. *et al.* PKH26 can transfer to host cells in vitro and vivo. *Stem Cells Dev.* **22,** 340–4 (2013).

186. Wang, M., Ma, X., Wang, J., Wang, L. & Wang, Y. Pretreatment with the γ-secretase inhibitor DAPT sensitizes drug-resistant ovarian cancer cells to cisplatin by downregulation of Notch signaling. *Int. J. Oncol.* **44,** 1401–9 (2014).

187. Kim, S.-H., Sehrawat, A., Sakao, K., Hahm, E.-R. & Singh, S. V. Notch activation by phenethyl isothiocyanate attenuates its inhibitory effect on prostate cancer cell migration. *PLoS One* **6,** e26615 (2011).

188. BLIGH, E. G. & DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* **37,** 911–7 (1959).

189. Sen, G. L. & Blau, H. M. A brief history of RNAi: the silence of the genes. *FASEB J.* **20,** 1293–9 (2006).

190. Badimon, L., Oñate, B. & Vilahur, G. Adipose-derived Mesenchymal Stem Cells and Their Reparative Potential in Ischemic Heart Disease. *Rev. española Cardiol. (English ed.)* **68,** 599–611 (2015).

191. Fox, C. S. *et al.* Abdominal visceral and subcutaneous adipose tissue compartments: association with metabolic risk factors in the Framingham Heart Study. *Circulation* **116,** 39–48 (2007).

192. Lim, S. & Meigs, J. B. Ectopic fat and cardiometabolic and vascular risk. *Int. J. Cardiol.* **169,** 166–76 (2013).

193. Chung, S. *et al.* Dietary cholesterol promotes adipocyte hypertrophy and adipose tissue inflammation in visceral, but not in subcutaneous, fat in monkeys. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **34,** 1880–7 (2014).

194. Lefebvre, A. M. *et al.* Depot-specific differences in adipose tissue gene expression in lean and obese subjects. *Diabetes* **47,** 98–103 (1998).

195. Gerhard, G. S. *et al.* Gene expression profiling in subcutaneous, visceral and epigastric adipose tissues of patients with extreme obesity. *Int. J. Obes.* **38,** 371–378 (2014).

196. Oñate, B. *et al.* Stem cells isolated from adipose tissue of obese patients show changes

in their transcriptomic profile that indicate loss in stemcellness and increased commitment to an adipocyte-like phenotype. *BMC Genomics* **14,** 625 (2013).

197. Lei, T. *et al.* HES1 inhibits adipogenesis of porcine mesenchymal stem cells via transcriptional repression of FAD24. *Domest. Anim. Endocrinol.* **45,** 28–32 (2013).

198. Song, B. *et al.* Inhibition of Notch Signaling Promotes the Adipogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells Through Autophagy Activation and PTEN-PI3K/AKT/mTOR Pathway. *Cell. Physiol. Biochem.* **36,** 1991–2002 (2015).

199. Majka, S. M., Barak, Y. & Klemm, D. J. Concise review: adipocyte origins: weighing the possibilities. *Stem Cells* **29,** 1034–40 (2011).

200. Hong, S. J., Traktuev, D. O. & March, K. L. Therapeutic potential of adipose-derived stem cells in vascular growth and tissue repair. *Curr. Opin. Organ Transplant.* **15,** 86–91 (2010).

201. Tepper, O. M. *et al.* Human endothelial progenitor cells from type II diabetics exhibit impaired proliferation, adhesion, and incorporation into vascular structures. *Circulation* **106,** 2781–6 (2002).

202. Tamarat, R. *et al.* Impairment in ischemia-induced neovascularization in diabetes: bone marrow mononuclear cell dysfunction and therapeutic potential of placenta growth factor treatment. *Am. J. Pathol.* **164,** 457–66 (2004).

203. Li, T.-S. *et al.* Impaired potency of bone marrow mononuclear cells for inducing therapeutic angiogenesis in obese diabetic rats. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **290,** H1362-9 (2006).

204. Vasa, M. *et al.* Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease. *Circ. Res.* **89,** E1-7 (2001).

205. Ramunni, A. *et al.* Effect of Low-Density Lipoprotein Apheresis on Circulating Endothelial Progenitor Cells in Familial Hypercholesterolemia. *Blood Purif.* **29,** 383–389 (2010).

206. Yang, Z. *et al.* Impaired endothelial progenitor cell activity is associated with reduced arterial elasticity in patients with essential hypertension. *Clin. Exp. Hypertens.* **32,** 444–52 (2010).

207. Kim, H. K. *et al.* Alterations in the proangiogenic functions of adipose tissue-derived stromal cells isolated from diabetic rats. *Stem Cells Dev.* **17,** 669–80 (2008).

208. Efimenko, A. *et al.* Adipose-derived mesenchymal stromal cells from aged patients with coronary artery disease keep mesenchymal stromal cell properties but exhibit characteristics of aging and have impaired angiogenic potential. *Stem Cells Transl. Med.* **3,** 32–41 (2014).

209. Wahl, E. A., Schenck, T. L., Machens, H.-G. & Egaña, J. T. Acute stimulation of mesenchymal stem cells with cigarette smoke extract affects their migration, differentiation, and paracrine potential. *Sci. Rep.* **6,** 22957 (2016).

210. Quito, F. L., Beh, J., Bashayan, O., Basilico, C. & Basch, R. S. Effects of fibroblast growth factor-4 (k-FGF) on long-term cultures of human bone marrow cells. *Blood* **87,** 1282–91 (1996).

211. Nichols, J. *et al.* Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell* **95,** 379–91 (1998).

212. Tsutsumi, S. *et al.* Retention of multilineage differentiation potential of mesenchymal cells during proliferation in response to FGF. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **288,** 413–9 (2001).

213. Estes, B. T., Wu, A. W., Storms, R. W. & Guilak, F. Extended passaging, but not aldehyde dehydrogenase activity, increases the chondrogenic potential of human adipose-derived adult stem cells. *J. Cell. Physiol.* **209,** 987–95 (2006).

214. Izadpanah, R. *et al.* Long-term in vitro expansion alters the biology of adult mesenchymal stem cells. *Cancer Res.* **68,** 4229–38 (2008).

215. Mansukhani, A., Ambrosetti, D., Holmes, G., Cornivelli, L. & Basilico, C. Sox2 induction by FGF and FGFR2 activating mutations inhibits Wnt signaling and osteoblast differentiation. *J. Cell Biol.* **168,** 1065–1076 (2005).

216. Tsai, C.-C., Su, P.-F., Huang, Y.-F., Yew, T.-L. & Hung, S.-C. Oct4 and Nanog Directly Regulate Dnmt1 to Maintain Self-Renewal and Undifferentiated State in Mesenchymal Stem Cells. *Mol. Cell* **47,** 169–182 (2012).

217. Mora-Castilla, S. *et al.* Transient Downregulation of Nanog and Oct4 Induced by DETA/NO Exposure in Mouse Embryonic Stem Cells Leads to Mesodermal/Endodermal Lineage Differentiation. *Stem Cells Int.* **2014,** ID 379678 (2014).

218. Kawai, M. & Rosen, C. J. PPARγ: a circadian transcription factor in adipogenesis and osteogenesis. *Nat. Rev. Endocrinol.* **6,** 629–36 (2010).

219. Lecka-Czernik, B. *et al.* Divergent effects of selective peroxisome proliferator-activated receptor-gamma 2 ligands on adipocyte versus osteoblast differentiation. *Endocrinology* **143,** 2376–84 (2002).

220. Nuttall, M. E. & Gimble, J. M. Controlling the balance between osteoblastogenesis and adipogenesis and the consequent therapeutic implications. *Curr. Opin. Pharmacol.* **4,** 290–294 (2004).

221. Xiao, L. *et al.* Disruption of the Fgf2 gene activates the adipogenic and suppresses the osteogenic program in mesenchymal marrow stromal stem cells. *Bone* **47,** 360–70 (2010).

222. Bekhite, M. M. *et al.* Hypoxia, leptin, and vascular endothelial growth factor stimulate vascular endothelial cell differentiation of human adipose tissue-derived stem cells. *Stem Cells Dev.* **23,** 333–51 (2014).

223. Gridley, T. Notch signaling in the vasculature. *Curr. Top. Dev. Biol.* **92,** 277–309 (2010).

224. Dejana, E. The Role of Wnt Signaling in Physiological and Pathological Angiogenesis. *Circ. Res.* **107,** 943–952 (2010).

225. O'Reilly, M. S. *et al.* Endostatin: An Endogenous Inhibitor of Angiogenesis and Tumor Growth. *Cell* **88,** 277–285 (1997).

226. Yamaguchi, N. *et al.* Endostatin inhibits VEGF-induced endothelial cell migration and tumor growth independently of zinc binding. *EMBO J.* **18,** 4414–4423 (1999).

227. Scheller, E. L. *et al.* Leptin Functions Peripherally to Regulate Differentiation of Mesenchymal Progenitor Cells. *Stem Cells* **28,** 1071–1080 (2010).

228. Rennert, R. C. *et al.* Diabetes impairs the angiogenic potential of adipose-derived stem cells by selectively depleting cellular subpopulations. *Stem Cell Res. Ther.* **5,** 79 (2014).

229. Togliatto, G. *et al.* Obesity reduces the pro-angiogenic potential of adipose tissue stem cell-derived extracellular vesicles (EVs) by impairing miR-126 content: impact on clinical applications. *Int. J. Obes. (Lond).* **40,** 102–11 (2016).

230. Kajstura, J. *et al.* Myocyte proliferation in end-stage cardiac failure in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95,** 8801–5 (1998).

231. Beltrami, A. P. *et al.* Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction. *N. Engl. J. Med.* **344,** 1750–7 (2001).

232. Finan, A. & Richard, S. Stimulating endogenous cardiac repair. *Front. cell Dev. Biol.* **3,** 57 (2015).

233. Hong, S., Alapure, B. V., Lu, Y., Tian, H. & Wang, Q. Immunohistological Localization of Endogenous Unlabeled Stem Cells in Wounded Skin. *J. Histochem. Cytochem.* **62,** 276–285 (2014).

234. Song, M. *et al.* The paracrine effects of mesenchymal stem cells stimulate the regeneration capacity of endogenous stem cells in the repair of a bladder-outlet-obstruction-induced overactive bladder. *Stem Cells Dev.* **23,** 654–63 (2014).

235. Li, M. & Ng, S. C. Potentiating the naturally occurring process for repair of damaged heart. *Curr. Pharm. Des.* **20,** 1950–63 (2014).

236. Khan, M. *et al.* Embryonic stem cell-derived exosomes promote endogenous repair mechanisms and enhance cardiac function following myocardial infarction. *Circ. Res.* **117,** 52–64 (2015).

237. Zhang, N. K. *et al.* Activation of Endogenous Cardiac Stem Cells by Apelin-13 in Infarcted Rat Heart. *Cell Transplant.* **25,** 1645–52 (2016).

238. Wang, C.-P. *et al.* Increased epicardial adipose tissue (EAT) volume in type 2 diabetes mellitus and association with metabolic syndrome and severity of coronary atherosclerosis. *Clin. Endocrinol. (Oxf).* **70,** 876–82 (2009).

239. Song, D. K. *et al.* Increased Epicardial Adipose Tissue Thickness in Type 2 Diabetes Mellitus and Obesity. *Diabetes Metab. J.* **39,** 405–13 (2015).

240. Fernández-Trasancos, A. *et al.* Impaired adipogenesis and insulin resistance in epicardial fat-mesenchymal cells from patients with cardiovascular disease. *J. Cell. Physiol.* **229,** 1722–30 (2014).

241. Nagata, H. *et al.* Cardiac Adipose-Derived Stem Cells Exhibit High Differentiation Potential to Cardiovascular Cells in C57BL/6 Mice. *Stem Cells Transl. Med.* **5,** 141–51 (2016).

242. Loskutoff, D. J., Curriden, S. A., Hu, G. & Deng, G. Regulation of cell adhesion by PAI-1. *APMIS* **107,** 54–61 (1999).

243. Efimenko, A. *et al.* Angiogenic properties of aged adipose derived mesenchymal stem cells after hypoxic conditioning. *J. Transl. Med.* **9,** 10 (2011).

244. Stefansson, S. *et al.* Inhibition of Angiogenesis in Vivo by Plasminogen Activator Inhibitor-1. *J. Biol. Chem.* **276,** 8135–8141 (2001).

245. Xin, X., Yang, S., Kowalski, J. & Gerritsen, M. E. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands are potent inhibitors of angiogenesis in vitro and in vivo. *J. Biol. Chem.* **274,** 9116–21 (1999).

246. Chapouton, P. *et al.* Notch activity levels control the balance between quiescence and recruitment of adult neural stem cells. *J. Neurosci.* **30,** 7961–74 (2010).

247. Ninov, N., Borius, M. & Stainier, D. Y. R. Different levels of Notch signaling regulate quiescence, renewal and differentiation in pancreatic endocrine progenitors. *Development* **139,** 1557–67 (2012).

248. Liu, J., Sato, C., Cerletti, M. & Wagers, A. Notch signaling in the regulation of stem cell self-renewal and differentiation. *Curr. Top. Dev. Biol.* **92,** 367–409 (2010).

249. Bigas, A. & Espinosa, L. Hematopoietic stem cells: to be or Notch to be. *Blood* **119,** 3226–35 (2012).

250. Fukada, S. *et al.* Hesr1 and Hesr3 are essential to generate undifferentiated quiescent satellite cells and to maintain satellite cell numbers. *Development* **138,** 4609–19 (2011).

251. Heisig, J. *et al.* Target Gene Analysis by Microarrays and Chromatin Immunoprecipitation Identifies HEY Proteins as Highly Redundant bHLH Repressors. *PLoS Genet.* **8,** e1002728 (2012).

252. Fischer, A., Schumacher, N., Maier, M., Sendtner, M. & Gessler, M. The Notch target genes Hey1 and Hey2 are required for embryonic vascular development. *Genes Dev.* **18,** 901–911 (2004).

253. Yan, X.-C. *et al.* miR-342-5p Is a Notch Downstream Molecule and Regulates Multiple Angiogenic Pathways Including Notch, Vascular Endothelial Growth Factor and Transforming Growth Factor β Signaling. *J. Am. Heart Assoc.* **5,** (2016).

254. Shawber, C. J. & Kitajewski, J. Notch function in the vasculature: insights from zebrafish, mouse and man. *BioEssays* **26,** 225–234 (2004).

255. Koch, U., Lehal, R. & Radtke, F. Stem cells living with a Notch. *Development* **140,** 689–704 (2013).

256. Borggrefe, T. *et al.* The Notch intracellular domain integrates signals from Wnt, Hedgehog, TGFβ/BMP and hypoxia pathways. *Biochim. Biophys. Acta* **1863,** 303–13 (2016).

257. Hellström, M. *et al.* Dll4 signalling through Notch1 regulates formation of tip cells during angiogenesis. *Nature* **445,** 776–80 (2007).

258. Guo, Y. *et al.* Advanced glycation end product-induced astrocytic differentiation of cultured neurospheres through inhibition of Notch-Hes1 pathway-mediated neurogenesis. *Int. J. Mol. Sci.* **15,** 159–70 (2014).

259. Hanauer, S. B. Obesity and visceral fat: a growing inflammatory disease. *Nat. Clin. Pract. Gastroenterol. Hepatol.* **2,** 245–245 (2005).

260. Faber, D. R. *et al.* Increased visceral adipose tissue mass is associated with increased C-reactive protein in patients with manifest vascular diseases. *Atherosclerosis* **212,** 274–280 (2010).

261. Pajvani, U. B. *et al.* Inhibition of Notch signaling ameliorates insulin resistance in a FoxO1-dependent manner. *Nat. Med.* **17,** 961–7 (2011).

262. Li, H., Lee, J., He, C., Zou, M.-H. & Xie, Z. Suppression of the mTORC1/STAT3/Notch1 pathway by activated AMPK prevents hepatic insulin resistance induced by excess amino acids. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **306,** E197-209 (2014).

263. Yiu, K.-H. & Tse, H.-F. Specific role of impaired glucose metabolism and diabetes mellitus in endothelial progenitor cell characteristics and function. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **34,** 1136–43 (2014).

264. Yan, J. *et al.* Type 2 diabetes restricts multipotency of mesenchymal stem cells and impairs their capacity to augment postischemic neovascularization in db/db mice. *J. Am. Heart Assoc.* **1,** e002238 (2012).

265. Cheuk, D. K. Optimal stem cell source for allogeneic stem cell transplantation for hematological malignancies. *World J. Transplant.* **3,** 99–112 (2013).

266. Scott, J. M. *et al.* Cardiovascular disease following hematopoietic stem cell transplantation: Pathogenesis, detection, and the cardioprotective role of aerobic training. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **98,** 222–34 (2016).

267. Kemper, J. K. Regulation of FXR transcriptional activity in health and disease: Emerging roles of FXR cofactors and post-translational modifications. *Biochim. Biophys. Acta* **1812,** 842–50 (2011).

268. Wollam, J. & Antebi, A. Sterol regulation of metabolism, homeostasis, and development. *Annu. Rev. Biochem.* **80,** 885–916 (2011).

269. Decker, K. Biologically active products of stimulated liver macrophages (Kupffer cells). *Eur. J. Biochem.* **192,** 245–61 (1990).

270. Saxena, U., Klein, M. G., Vanni, T. M. & Goldberg, I. J. Lipoprotein lipase increases low density lipoprotein retention by subendothelial cell matrix. *J. Clin. Invest.* **89,** 373–80 (1992).

271. Ishibashi, S. *et al.* Apolipoprotein E and lipoprotein lipase secreted from human monocyte-derived macrophages modulate very low density lipoprotein uptake. *J. Biol. Chem.* **265,** 3040–7 (1990).

272. Mahabadi, A. A. *et al.* Association of pericoronary fat volume with atherosclerotic plaque burden in the underlying coronary artery: A segment analysis. *Atherosclerosis* **211,** 195–199 (2010).

273. Omar, A., Chatterjee, T. K., Tang, Y., Hui, D. Y. & Weintraub, N. L. Proinflammatory phenotype of perivascular adipocytes. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **34,** 1631–6 (2014).

274. Chatterjee, T. K. *et al.* Human coronary artery perivascular adipocytes overexpress genes responsible for regulating vascular morphology, inflammation, and hemostasis. *Physiol. Genomics* **45,** 697–709 (2013).

275. van Hinsbergh, V. W. M., Eringa, E. C. & Daemen, M. J. A. P. Neovascularization of the atherosclerotic plaque: interplay between atherosclerotic lesion, adventitia-derived microvessels and perivascular fat. *Curr. Opin. Lipidol.* **26,** 405–11 (2015).

276. Moreno, P. R. & Fuster, V. New aspects in the pathogenesis of diabetic atherothrombosis. *J. Am. Coll. Cardiol.* **44,** 2293–2300 (2004).

277. Hayden, M. R. & Tyagi, S. C. Vasa vasorum in plaque angiogenesis, metabolic syndrome, type 2 diabetes mellitus, and atheroscleropathy: a malignant transformation. *Cardiovasc. Diabetol.* **3,** 1 (2004).

278. Moreno, P. R., Purushothaman, K.-R., Sirol, M., Levy, A. P. & Fuster, V. Neovascularization in human atherosclerosis. *Circulation* **113,** 2245–52 (2006).

279. Michel, J.-B., Virmani, R., Arbustini, E. & Pasterkamp, G. Intraplaque haemorrhages as the trigger of plaque vulnerability. *Eur. Heart J.* **32,** (2011).

280. Rittig, K. *et al.* The secretion pattern of perivascular fat cells is different from that of subcutaneous and visceral fat cells. *Diabetologia* **55,** 1514–25 (2012).

281. Koch, S. & Claesson-Welsh, L. Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2,** a006502 (2012).

282. Chen, J. *et al.* Tissue Factor - A Receptor Involved in the Control of Cellular Properties, Including Angiogenesis. *Thromb. Haemost.* **86,** 334–45 (2001).

283. Arderiu, G., Peña, E., Aledo, R., Juan-Babot, O. & Badimon, L. Tissue factor regulates microvessel formation and stabilization by induction of chemokine (C-C motif) ligand 2 expression. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **31,** 2607–15 (2011).

284. Arderiu, G., Peña, E. & Badimon, L. Angiogenic microvascular endothelial cells release microparticles rich in tissue factor that promotes postischemic collateral vessel formation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **35,** 348–57 (2015).

285. Ip, J. H. *et al.* Syndromes of accelerated atherosclerosis: role of vascular injury and smooth muscle cell proliferation. *J. Am. Coll. Cardiol.* **15,** 1667–87 (1990).

286. Orlandi, A. The contribution of resident vascular stem cells to arterial pathology. *Int. J. stem cells* **8,** 9–17 (2015).

287. Traktuev, D. O. *et al.* A population of multipotent CD34-positive adipose stromal cells share pericyte and mesenchymal surface markers, reside in a periendothelial location, and stabilize endothelial networks. *Circ. Res.* **102,** 77–85 (2008).

288. Krawiec, J. T. *et al.* A cautionary tale for autologous vascular tissue engineering: impact of human demographics on the ability of adipose-derived mesenchymal stem cells to recruit and differentiate into smooth muscle cells. *Tissue Eng. Part A* **21,** 426–37 (2015).

289. Bennett, M. R., Sinha, S. & Owens, G. K. Vascular Smooth Muscle Cells in Atherosclerosis. *Circ. Res.* **118,** 692–702 (2016).

290. Marchington, J. M., Mattacks, C. A. & Pond, C. M. Adipose tissue in the mammalian heart and pericardium: Structure, foetal development and biochemical properties. *Comp. Biochem. Physiol. Part B Comp. Biochem.* **94,** 225–232 (1989).

291. Drake, T. A., Hannani, K., Fei, H. H., Lavi, S. & Berliner, J. A. Minimally oxidized low-density lipoprotein induces tissue factor expression in cultured human endothelial cells. *Am. J. Pathol.* **138,** 601–7 (1991).

292. Penn, M. S., Patel, C. V, Cui, M. Z., DiCorleto, P. E. & Chisolm, G. M. LDL increases inactive tissue factor on vascular smooth muscle cell surfaces: hydrogen peroxide activates latent cell surface tissue factor. *Circulation* **99,** 1753–9 (1999).

293. Haslinger, B., Kleemann, R., Toet, K. H. & Kooistra, T. Simvastatin suppresses tissue factor expression and increases fibrinolytic activity in tumor necrosis factor-alpha-activated human peritoneal mesothelial cells. *Kidney Int.* **63,** 2065–74 (2003).

294. Ferro, D. *et al.* Simvastatin reduces monocyte-tissue-factor expression type IIa hypercholesterolaemia. *Lancet* **350,** 1222 (1997).

295. Drake, T. A., Morrissey, J. H. & Edgington, T. S. Selective cellular expression of tissue factor in human tissues. Implications for disorders of hemostasis and thrombosis. *Am. J.*

Pathol. **134,** 1087–97 (1989).

296. Peña, E., Arderiu, G. & Badimon, L. Subcellular localization of tissue factor and human coronary artery smooth muscle cell migration. *J. Thromb. Haemost.* **10,** 2373–82 (2012).

297. Badimon, L., Storey, R. F. & Vilahur, G. Update on lipids, inflammation and atherothrombosis. *Thromb. Haemost.* **105,** S34-42 (2011).

298. Bayes-Genis, A. *et al.* Human progenitor cells derived from cardiac adipose tissue ameliorate myocardial infarction in rodents. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **49,** 771–80 (2010).