



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Intervenciones nutricionales en la prevención cardiovascular y efectos de los factores de riesgo en el tejido adiposo

Carmen Lambert Goitia

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 BIOTECNOLOGÍA

**INTERVENCIONES NUTRICIONALES EN LA
PREVENCIÓN CARDIOVASCULAR Y
EFECTOS DE LOS FACTORES DE RIESGO EN
EL TEJIDO ADIPOSO**

Carmen Lambert Goitia

TESIS DOCTORAL

2019

UNIVERSIDAD DE BARCELONA
Facultad de Farmacia y Ciencias de la Alimentación
Programa de Doctorado en Biotecnología

**INTERVENCIONES NUTRICIONALES EN LA PREVENCIÓN
CARDIOVASCULAR Y EFECTOS DE LOS FACTORES DE
RIESGO EN EL TEJIDO ADIPOSO**

Memoria presentada por:

Carmen Lambert Goitia

Para optar al título de Doctor por la Universidad de Barcelona

Programa Cardiovascular - ICCC
Institut de Reserca, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau

La directora,

La tutora,

La doctoranda,

Prof. Lina

Prof. Josefa

Carmen

Badimon Maestro

Badía Palacín

Lambert Goitia

Barcelona, 2019

A mi familia

AGRADECIMIENTOS

¡Por fin!, tras un largo y no siempre fácil camino, con un montón de experimentos, de resultados, de frustraciones y por suerte, también alguna victoria, puedo al fin ver reflejado todos estos años de trabajo y aprendizaje en mi tesis doctoral. Como todos sabéis, hacer una tesis no es una tarea fácil y sin la ayuda y colaboración de toda la gente que me rodea habría sido imposible. ¡Moltes gràcies a tots!

En primer lugar me gustaría darle las gracias a mi directora de tesis, Lina Badimon. Lina, gracias por haber confiado en mí desde el primer día, dándome la oportunidad de descubrir este maravilloso mundo que es la investigación. No dejo de sorprenderme cada vez que entro en tu despacho y me das una lección de puro conocimiento científico. Ha sido un verdadero honor haber aprendido de alguien tan extraordinario.

Teresa, gracias por haber estado siempre ahí cuando te necesite, por abrirme siempre la puerta de tu despacho y por toda la ayuda recibida durante estos 5 años. Gracias también por todas esas riñas que nos llevamos por no ser capaces de estar en silencio ni 5 minutos, al final acabé entendiéndote y ¡ahora soy yo la que pide silencio!.

Judit, las palabras contigo se me quedan cortas. ¡GRACIAS!. Gracias por enseñarme todo lo que sé, por ayudarme a cada paso, por obligarme a ser exigente conmigo misma y no conformarme con nada que no fuese la perfección. Si esta tesis es de alguien, es tuya. Y Loli, por supuesto, si con Judit aprendí a dar lo mejor de mí, tú me enseñaste como hacerlo. Gracias, gracias y mil veces gracias.

AGRADECIMIENTOS

¡Espero que de vez en cuando escuchéis a los caballitos pony y algún villancico en el laboratorio para acordaros de mí!

Gemma Vilahur, desde que nos juntamos en Valladolid con una copa de vino en la mano no me puedo imaginar un congreso sin ti. Gracias por esa alegría, ese positivismo y ese amor a la ciencia que irradias allá donde vas.

Y si hay otra persona de la que no me puedo olvidar eres tú Maite. Gracias por dejarme cuidar tus células y enseñarme a quererlas como hijas. Por las conversaciones sinceras que me ayudaron a ver las cosas claras cuando todo era un borrón negro en mi cabeza y por todos los buenos consejos que me diste. Espero que te vaya todo muy bien y que seáis muy felices los tres por Inglaterra y de corazón, ¡gracias!. Espero hacerte una visita pronto.

Gracias a mis compañeros del 004, que durante estos años han ido cambiando, pero que siempre han tenido algo en común, estar ahí para ayudar o echarse unas risas cuando era necesario. Ona, conseguiste, no sólo ser una gran compañera de trabajo, sino también una muy buena amiga cuando más me hacía falta. Si no fuese por ti, es posible que no hubiese aguantado estos 5 años. Gracias por ser capaz de saber lo que necesitaba sin que yo tuviese que pedirlo (que ya sabes que eso siempre me ha costado mucho). Sin ti ya nada es lo mismo, pero ya sabes, os espero a Aleix a Pol y a ti en el norte. Alba, aunque hace tiempo que no estás por aquí, contigo he pasado algunos de los mejores momentos en el laboratorio, compartiendo tortillitas de camarones, riñas de teresa y por supuesto, vigilando siempre antes de irnos ¡que la nevera se

AGRADECIMIENTOS

quedase cerrada!. Olaya, que decir de ti, la sangre nos une, no se puede pedir más. Me ha encantado trabajar mano a mano contigo estos últimos meses, eres incombustible, trabajas como nadie, de verdad que es un lujo tenerte ahí, y no sólo laboralmente, también como amiga. ¡¡Nos vemos por Urbiés!! Esther Gerbolés, tú no eres del 004, pero como no hay quien te eche, ¡habrá que adoptarte! Gracias por hacer de mami y cuidarme todos estos años. Por las largas tardes en cultivos y por estar siempre pendiente de mí, te voy a echar mucho de menos. A los becarios, Natalia, Alba, Elisa, Alex, Vicky y Hue mucha suerte con todo lo que os queda por aprender, disfrutarlo mucho, que aunque parece que no hay fin, el final siempre llega. Natalia, espero que en este año y pico de jefa te haya enseñado mucho (al menos lo más importante), y ya verás, tendrás una gran tesis, todo el esfuerzo, los fines de semana en el lab, las horas en cultivos, etc. tienen su recompensa. ¡Mucha suerte!. Hue, I'm really proud of you. What you have learnt in two months is incredible! And always with a smile on your face! It was a real pleasure to work with you. Good luck in this new project, and remember that you can call me whenever you need. Tomeu, ánimo con las ASC, al final se les cogen mucho cariño ya lo verás. Montse, siento todos los viajes al biobanco, pero ya ves, ¡al final conseguimos terminar con tu amigo WILD-Peset!

Gracias al laboratorio 110 (y los que no son del 110), de verdad que da gusto pasar el rato con vosotros. Saray, me ha encantado conocerte y haber podido pasar estos últimos años contigo, entre carreras y cervezas, y cervezas y carreras y alguna que otra mordidita. Vale, y también escribiendo una tesis ("*Bebiendo, así*

AGRADECIMIENTOS

ssaca un tesis" ¡y así lo hicimos!). Y hablando de mordiditas, cervezas y carreras, David, gracias por faceme sentir como si tuviese en casina, sigue haciendo ciencia de altu impactu, ¡espérote en casa con un buen cachopo! Soumaya, ¡qué decir de ti!, cuantos momentos hemos pasado juntas este último año... gracias por ser mi profesora en las largas horas de escritura y análisis de datos en la biblioteca. Me ha encantado compartir contigo estos últimos congresos, ¡sobretudo Lisboa claro! Eres una gran persona y una aún mejor compañera, gracias de corazón. Laia, si hay algo que echaré de menos es tu terraza jajaja. Gracias por tu hospitalidad siempre, y por darle el punto dulce a nuestros días, ya sabes que yo sólo voy a comer si tú haces postre jejeje. ¡Mucho ánimo con la recta final! Javi, no sé qué haré a partir de ahora sin verte cada mañana.... Gracias por tu humor, por siempre tener algo divertido para hacernos pasar el rato, igual que tú Gemma, cada día un nuevo chiste en el teléfono. Empezamos casi juntas (y con muchos pica-pica todo hay que decirlo), y aquí estamos varios años después, sin la proteómica, pero felices. Gracias por toda la sinceridad de estos últimos meses, me ha servido de mucho. Sergi, he pasado momentos muy divertidos contigo, muchas gracias por todo, siempre tendré un gran recuerdo tuyo. Mar, Ingrid (¡¡hay Ingrid cuanto se te echa de menos!!, me debes una pregunta, ¡y lo sabes!), Teresa, Miquel, María, Silvia, Judith ha sido un placer pasar todos esos meses con vosotros, gracias por acogerme.

Laura Nasarre, eres de las mejores personas que he conocido en este centro. Gracias por los consejos, las cervezas, por las botellas de vino a medias y por todas las charlas y desahogos que he tenido

contigo (que no han sido pocos). Cuando quieras montamos un negocio por el norte, pero habrá que buscar alguien se nos cuide las plantas... y si pasa algo ya sabes, ¡nos vemos en la frontera con la tele y la Thermomix!

Josep, Maribel y Oriol, ¡Menudas noches de quirófano nos pasamos! Oriol y Maribel, gracias por compartir todo vuestro conocimiento conmigo y Josep, gracias por ser mi compañero cuando me quedé sola, contigo hasta venir a trabajar a las 4 de la mañana se hace divertido.

Rosa Aledo, gracias por estar siempre dispuesta a ayudar, por todos los consejos y por las galletitas que nos traías y nos ayudaban a aguantar mejor los días. Maisa, entre el Maldi y el HPLC ¡media tesis también es tuya! ¡Algún año volveré para las fiestas! Gemma Arderiù, ha sido un placer conocer el mundo de las microvesículas de tu mano. Gracias por ayudarme tanto en el último tramo final de la tesis, sin ti todo habría sido muchísimo más difícil. Esther Peña, gracias por haberme ayudado siempre que lo he necesitado, por los buenos consejos y por abrirme tu puerta siempre que lo necesité. María Borrel, gracias por las charlas Runneras, por las galletas, los consejos y por ayudarme y aconsejarme cuando lo necesitaba. Laura Casaní, aunque no hemos trabajado juntas (ni siquiera en el mismo edificio), me ha encantado conocerte, me lo he pasado muy bien contigo cada vez que coincidíamos. Gracias por toda la ayuda con la tesis, por todos los consejos y por todas las veces que me preguntabas; bueno Carmen, ¿y la tesis pa cuándo?, pues aunque ha costado, ¡aquí esta!.

AGRADECIMIENTOS

Gracias al resto de compañeros que aún no he nombrado, Mónica Pescador, nº 1 en extracciones de sangre, ¡aquí tu voluntaria favorita!, a mi si no me sacas sangre tú, ¡no me la saca nadie! ;), Mari, Sonia, Pablo, Javier, Rafael, M^a Àngels. A las compañeras del grupo de Leif, Carmen, Vero, Hildegard ¡que pena haberos descubierto tan tarde! Gracias a Silvia y Maria José por toda la ayuda con la burocracia (interna y externa), con vosotras siempre era todo mucho más fácil. Y no puedo olvidarme de Laura Buendía, gracias por estar pendiente siempre de que tuviese todo a punto en cultivos, sin duda contigo la vida era muchísimo más fácil.

Gracias a mi otra familia de aquí, mis compañeros de entrenamiento, sobre todo a mis rapazinos; Sonia (mi asturiana), Elena, Dani, Evita, Irma y Joan, gracias a todos por ser mi vía de escape de los largos días de trabajo.

Gracias a mis amigas, por siempre, siempre, siempre estar ahí, aún estando a mil kilómetros siempre habéis estado conmigo. Loti, gracias por estar a mi lado desde los 3 años hasta ahora, en uno de los momentos más importantes de mi carrera, convirtiéndote en la parte artística de mi tesis. Amigas como tú hay pocas. Silvia, gracias por todas las horas al teléfono, por tu amistad incondicional, y por ayudarme a ver cuando las cosas deben cambiarse. Ahora te toca a ti, muchísimo ánimo y recuerda que siempre podrás contar conmigo. Lau, llevamos toda una vida juntas... Gracias por ponerle humor a mi vida cuando lo necesitaba, y razón a las cosas cuando no era capaz de ver con claridad. Tere, mi Pin y Pon. Tu llegada a Barcelona ha sido el empujón que necesitaba para sobrevivir estos últimos meses. Gracias por todas las rutas bajo la nieve que tanto

AGRADECIMIENTOS

bien me hicieron, por las fabadonas, y por hacernos ver a todas que siempre se puede sacar tiempo para salir a tomar algo. Ana, gracias por ayudarme a ver, analizar y superar las dificultades, por tantas charlas con una copa de vino en la mano y por estar siempre dispuesta a ayudar cuando era necesario. Clau, gracias a ti también por hacernos ver siempre el mundo desde otra perspectiva, ayudándonos muchas veces a ver realidades que no éramos capaces de ver, eres sin duda una de las mejores personas que conozco. Muchísima suerte en todo, y ¡pétalo fuerte en la residencia! Clara, una tesis con fisio personal siempre es mucho más fácil, muchas gracias por cuidar tanto mi espalda. Cova, con tantas guardias y trabajo me hiciste ver que no era yo la única pringada. Gracias por el toque de cordura y organización que nos das siempre. Ele, que decir de ti, siempre has estado ahí dándole alegría a mi vida. Eres casi como mi hermana, y te quiero como tal. Si algo tengo claro, es que estés en el lugar del mundo que estés, siempre podré contar contigo.

Javi, gracias por aguantarme y animarme tanto en esta última etapa. Por entender mi trabajo y por ofrecerme siempre un plan para despejarme, pero sobre todo, gracias por todo el amor y cariño que me das cada día. Gracias por hacerme tan feliz.

Pero si a alguien tengo que agradecer es a mi familia. A mis abuelos, aunque ya no estén aquí, a José, siempre me hiciste sentir tu ojito derecho, se que allá donde estés, estarás orgulloso de mi. A todos mis tíos y primos que siempre han cuidado tanto de la niña de la casa. A ti Juan, gracias por ser mi mejor escudero, por enseñarme a defenderme y por estar siempre dispuesto a cortar

AGRADECIMIENTOS

alguna pierna por mi si la ocasión lo requiere. Dani, aunque no te enteres de mucho aún, gracias por existir, y por ser el único capaz de hacerme sonreír en los días en los que parecía que el mundo se me venía encima. Y por supuesto, Mamá, Papá, ¡GRACIAS! Gracias por educarme y hacer de mí la persona que hoy soy. Gracias por toda la confianza y fe que habéis tenido en mí. Mami, gracias por no dejarme abandonar, por enseñarme que si empiezo algo, no puedo rendirme a medio camino. Porque me conoces mejor de lo que yo me conozco a mí misma y sabes siempre lo que necesito. Y por supuesto, gracias por todos esos tappers que han permitido que no muriese de desnutrición durante estos 5 años. Papi, gracias por contagiarme de tu amor por la ciencia y la medicina, por haberme dado la oportunidad de estar aquí y de ser quien soy ahora. Gracias por todos esos madrugones para coger el avión de la mañana y por todas las largas noches en Ranón esperando por un Vueling que nunca llegaba. Mamá, Papá, esta tesis es para vosotros.

*“El talent depèn de la inspiració,
però l'esforç depèn de cadascú”*

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS iii

ÍNDICE xiii

ÍNDICE DE FIGURAS..... xv

ÍNDICE DE TABLAS xiii

ABREVIATURAS.....xvii

RESUMENxxiii

INTRODUCCIÓN 27

1. LAS ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES 3

 1.1 Tipos de enfermedades cardiovasculares 4

 1.2. La patología cardiovascular 6

 1.2.1 Aterosclerosis 6

 1.2.2 Angiogénesis y vasculogénesis en la ECV 7

 1.2.3. Inflamación..... 10

2. FACTORES DE RIESGO CARDIOVASCULAR 11

 2.1 Obesidad 12

 2.3 Dislipemia..... 16

 2.3.1 Colesterol-HDL 18

 2.3.2 Colesterol-LDL 19

 2.3.3 Triglicéridos 20

 2.3.4 Tratamiento farmacológico..... 20

 2.2 Diabetes 22

 2.5.1 El síndrome metabólico 25

3. PREVENCIÓN DE LAS ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES 27

 3.1 Importancia de la nutrición en la enfermedad cardiovascular 28

 3.2 Ácidos grasos Omega-3 29

 3.3 Fitoesteroles. 30

4. EL TEJIDO ADIPOSO 32

4.1 El tejido adiposo pardo o marrón	33
4.2 El tejido adiposo blanco	34
4.2.1 Tejido adiposo Subcutáneo	36
4.2.2 Tejido adiposo Visceral.....	37
4.2.3 Tipos de células existentes en el tejido adiposo blanco.....	39
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	43
MATERIALES Y MÉTODOS	49
1. DISEÑO EXPERIMENTAL	51
2. POBLACIONES DE ESTUDIO	52
2.1 Estudio del efecto de la leche suplementada con omega-3 o fitoesteroles	52
2.2 Estudio del efecto del edulcorante Fruit-Up®	53
2.3 Estudio del efecto de la diabetes en el tejido adiposo de pacientes obesos.	55
2.4 Estudio de la importancia de la localización del tejido adiposo cardíaco.....	55
3. MODELO ANIMAL	57
4. ANÁLISIS PROTEÓMICO.....	59
4.1.Obtención de las muestras	60
4.2 Preparación De La Muestra.....	60
4.2.1. Subfraccionamiento del suero y plasma humano para la extracción de proteínas mayoritarias	61
4.2.2. Concentración de proteínas del suero	62
4.2.3. Extracción de proteínas de HDL humanas.....	62
4.2.4. Extracción de proteínas de las LDL humanas	62
4.2.5 Extracción de la fracción soluble proteica del plasma.	63
4.2.6 Extracción de proteínas del tejido adiposo	63
4.2.7 Cuantificación de proteínas	64
4.3 Electroforesis Bidimensional.....	64

4.3.1 Primera dimensión	65
4.3.2 Segunda dimensión	66
4.4 Análisis Diferencial	67
4.5 Identificación De Las Proteínas.	67
4.6 Técnicas De Validación	69
4.6.1 Cuantificación de los niveles de proteína séricos.....	69
4.6.2 Western-blot (WB)	70
5. TEJIDO ADIPOSO	72
5.1 Obtención de las muestras.....	72
5.1.1 Obtención de las células madre del tejido adiposo (ASC)	72
5.1.2 Aislamiento de las microvesículas derivadas de las ASC	74
6. ENSAYOS DE BIOLOGÍA CELULAR.....	76
6.1Otros tipos de células utilizados	76
6.1.1 HMEC.....	76
6.2 Citometría de Flujo.....	76
6.3 Viabilidad y proliferación celular.....	78
6.4 Ensayo de migración celular in vitro	79
6.5 Ensayo de crecimiento celular	80
6.6 Angiogénesis in vitro	80
7. ANÁLISIS DE LOS NIVELES DE mRNA Y miRNA.....	83
7.1 Obtención del mRNAy miRNA	83
7.1.1 Extracción de mRNA a partir de muestras de sangre.....	83
7.1.2 Obtención de mRNA a partir de tejido	83
7.1.3 Obtención de mRNA y microRNA a partir de un cultivo celular.....	83
7.2 Cuantificación del RNA.....	84
7.3 Síntesis del DNA complementario.....	85
7.3.1 Síntesis de cDNA a partir de mRNA.....	85
7.3.1 Síntesis de cDNA a partir de miRNA	86
7.4 PCR a tiempo real.....	88
7.4.1 PCR para muestras de mRNA	88

ÍNDICE

7.5.2 PCR para miRNA	89
RESULTADOS	91
ARTÍCULO 1	93
ARTÍCULO 2	117
ARTÍCULO 3	139
ARTÍCULO 4	171
DISCUSIÓN.....	209
CONCLUSIONES	227
BIBLIOGRAFÍA.....	231

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Causas de muerte en España durante el año 2015.....	4
Figura 2. Caracterización y localización de las enfermedades cardiovasculares.....	5
Figura 3. Estructura de la pared arterial.	6
Figura 4. Esquema de la formación de la vasculatura madura.	8
Figura 5. Etapas del proceso de angiogénesis.....	9
Figura 6. Clasificación de los factores de riesgo cardiovascular	12
Figura 7. Mapa de la prevalencia de obesidad y el sobrepeso	13
Figura 8. Estructura general de las lipoproteínas.	17
Figura 9. Esquema general del metabolismo de las lipoproteínas....	19
Figura 10. Mecanismo de entrada de las lipoproteínas en la pared arterial y formación de la placa aterosclerótica	20
Figura 11. Mecanismo de actuación de los inhibidores del PCSK9 ..	21
Figura 12. Mapa de la estimación de prevalencia de diabetes.....	23
Figura 13. Mecanismo de actuación de los diferentes tipos de diabetes.	25
Figura 14. Principales factores de riesgo del síndrome metabólico ..	26
Figura 15. Clasificación y origen de algunos de los ácidos grasos poliinsaturados más comunes de la dieta	29
Figura 16. Estructura del colesterol y de los principales fitoesteroles encontrados en las plantas.....	31

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 17. Tejido adiposo blanco.....	34
Figura 18. Consecuencias fisiológicas de la obesidad en el tejido adiposo.	36
Figura 19. Anatomía interna y externa del corazón.....	38
Figura 20. Procesos fisiológicos y metabólicos regulados por el TAB mediante la secreción de adipocinas.	40
Figura 21. Diseño experimental.....	51
Figura 22. Esquema de las intervenciones del estudio.	53
Figura 23. Esquema del análisis proteómico.....	59
Figura 24. Esquema del procedimiento utilizado para el aislamiento de las ASC a partir de una muestra de tejido adiposo.	73
Figura 25. Esquema del procedimiento utilizado para el aislamiento de las microvesículas a partir de medio de cultivo.	75
Figura 26. Detalle del procedimiento de siembra en placas Ibidi Culture-Insert.....	80
Figura 27. Angiogénesis in vivo.....	81
Figura 28. Extracción de RNA.....	84

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación internacional de los adultos según su IMC. 14

Tabla 2. Características y composición de las lipoproteínas. 17

Tabla 3. Características de los tejidos adiposos blanco y marrón. 33

Tabla 4. Condiciones de la 2-DE para los diferentes tipos de muestra65

Tabla 5. Programa de voltajes del IEF 66

Tabla 6. Kits ELISA utilizados 69

Tabla 7. Diferentes Kits BioPlex utilizados..... 70

Tabla 8. Anticuerpos utilizados para WB 71

Tabla 9. Anticuerpos utilizados para la caracterización por citometría de flujo de las células madre mesenquimales provenientes del tejido adiposo..... 78

Tabla 10. Composición del medio EGM-2 utilizado para los ensayos de angiogénesis in vitro..... 82

Tabla 11. Reactivos utilizados en la reacción de Transcripción Reversa 85

Tabla 12. Programa utilizado en el termociclador para la síntesis de DNA complementario 85

Tabla 13. Reactivos de la reacción polyA 86

Tabla 14. Reactivos de la reacción de ligación 87

Tabla 15. Reactivos de la transcripción reversa 87

Tabla 16. Reactivos de la reacción de amplificación 88

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 17. Reactivos utilizados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	89
Tabla 18. Reactivos de la PCR para miRNA.....	90

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

2DE	Electroforesis bidimensional (<i>Two dimmensional electrophoresis</i>)
AHA	Asociaciónn americana del corazón (<i>American heart association</i>)
ANGPT	Angiopietina (<i>Angiopietin</i>)
APO	Apolipoproteína (<i>Apolipoprotein</i>)
ASC	Célula madre derivada de tejido adiposo (<i>Adipose stem cell</i>)
CCL2	Citoquina ligando motivo C-C 2 (<i>C-C motif chemokine ligand 2</i>)
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario (<i>Complementary deoxyribonucleic acid</i>)
CE	Ester de colesterol (<i>cholesterol esters</i>)
COL18A1	Cadena alfa-1 del colágeno XVIII (<i>Collagen Type XVIII Alpha 1 Chain</i>)
cHDL	Colesterol HDL
cLDL	Colesterol LDL
DM	Diabetes mellitus
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
ECV	Enfermedad cardiovascular
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>)
FBS	Suero fetal bobinao (<i>Fetal bobine serum</i>)
FC	Colesterol libre (<i>Free cholesterol</i>)
FRCV	Factores de riesgo cardiovascular
GAPDH	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>)
GIP	Péptido inhibidor gástrico (<i>Gastric inhibitory polypeptide</i>)
GLP	Péptido similar al glucagón (<i>Glucagon like polypeptide</i>)

ABREVIATURAS

GLUT-2	Transportador de glucosa 2 (<i>Glucose transporter 2</i>)
GOT	Transaminasa glutámico-oxalacética (<i>Glutamic oxaloacetic transaminase</i>)
GPT	transaminasa glutámico pirúvica (<i>Glutamic pyruvic transaminase</i>)
HDL	Lipoproteínas de alta densidad (<i>High density lipoprotein</i>)
HMEC	Células endoteliales microvasculares humanas (<i>Human microvascular endothelial cells</i>)
IDF	Federación internacional de diabetes (<i>International diabetes federation</i>)
IDL	Lipoproteínas de densidad intermedia (<i>Intermediate density lipoproteins</i>)
IEF	Isoelectroenfoque (<i>isoelectric focusing</i>)
IgA	Inmunoglobulina (<i>Immunoglobulin</i>)
IGF1	Factor de crecimiento similar a la insulina-1 (<i>Insulin like growth factor 1</i>)
IGT	Intolerancia a la glucosa (<i>Impaired glucose tolerance</i>)
IL	Interleucina (<i>Interleukin</i>)
IMC	Índice de masa corporal (<i>BMI-Body mass index</i>)
INE	Instituto nacional de estadística
IPA	<i>Ingenuity pathway analysis</i>
LAD	Lateral anterior descendente (<i>Left anterior descendent</i>)
LCAT	Lecitin Colesterol Acil Transferasa (<i>Lecithin-cholesterol acyltransferase</i>)
LDL	Lipoproteína de baja densidad (<i>Low density lipoprotein</i>)
LPDP	Plasma libre de lípidos (<i>Lipid depleted plasma</i>)

MALDI	desorción/ionización mediante láser asistida por Matriz
Met-S	Síndrome metabólico (<i>Metabolic syndrom</i>)
MMPs	metaloproteinasas de matriz extracelular (<i>matrix metalloproteinases</i>)
miRNA	Micro ácido ribonucleico (<i>Micro ribonucleic acid</i>)
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero (<i>Messenger ribonucleic acid</i>)
MS	Espectrometría de masas (<i>Mass spectrometry</i>)
MVs	Microvesículas
OMS	Organización mundial de la salud (<i>WHO – World heart organization</i>)
PBS	Tampón fosfato salino (<i>Phosphate buffered saline</i>)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (<i>Polymerase chain reaction</i>)
PEB	Bebida edulcorada a base de pinitol (<i>Pinitol enriched beberage</i>)
PhyS	Fitoesteroles (Phytosterols)
PLTP	Proteína de transferencia de fofolípidos (<i>Phospholipid transfer protein</i>)
PON-1	Paraoxonasa 1 (<i>Paraoxonase 1</i>)
RNA	Ácido ribonucleico (<i>Ribonucleic acid</i>)
RPLP0	Proteína ribosomal grande P0 (<i>Ribosomal Protein, Large, P0</i>)
SAP	Componente sérico amilode P (<i>Serum amyloid P</i>)
SDS-PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>)
SEB	Bebida edulcorada a base de sacarosa (<i>sucrose enriched beberage</i>)
SVF	Fración vascular del estroma (<i>Stromal vascular fraction</i>)

ABREVIATURAS

TA	Tejido adiposo
TA-B	Tejido adiposo blanco (<i>WAT – White adipose tissue</i>)
TA-M	Tejido adiposo marron (<i>BAT – Brown adipose tissue</i>)
TA-S	Tejido adiposo subcutáneo (<i>SWAT – subcutaneous adipose tissue</i>)
TA-PV	Tejido adiposo perivascular (<i>PVAT – perivascular adipose tissue</i>)
TA-V	Tejido adiposo visceral (<i>VWAT – visceral adipose tissue</i>)
TA-VM	Tejido adiposo ventricular del miocardio (<i>VMAT - ventricular myocardium adipose tissue</i>)
TF	Factori tisular (<i>Tissue factor</i>)
TG	Triglicéridos (<i>Triglyceride</i>)
TOF	Tiempo de vuelo (<i>Time of flight</i>)
TRC	Transporte reverso del colesterol
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular (<i>Vascular endothelial growth factor</i>)
VLDL	Lipoproteínas de muy baja densidad (<i>Very low density lipoproteins</i>)
VSMC	Células musculares lisas vasculares (<i>Vascular smooth muscle cells</i>)
WB	Western blot
ZDF	Zucker diabéticas obesas (<i>Zucker Diabetic Fatty</i>)
ω3	Omega -3

RESUMEN

Las enfermedades cardiovasculares son una de las principales causas de mortalidad y morbilidad a nivel mundial, apareciendo como consecuencia de la acumulación de diversos factores de riesgo, tanto genéticos como ambientales. De entre los factores de riesgo cardiovascular modificables, es decir, aquellos que podemos evitar, destacan entre otros la obesidad, la diabetes y la dislipemia, con cada vez más incidencia tanto en los países desarrollados como en aquellos en vías de desarrollo. Por tanto, en los últimos años, la búsqueda de estrategias que permitan entender mejor estas patologías, así como que nos ayuden a prevenirlas, han adquirido una gran importancia.

En esta tesis hemos analizado el uso de intervenciones nutricionales, para prevenir y reducir la aparición de diferentes factores de riesgo cardiovascular, ayudando por tanto a prevenir, no solo la aparición de las enfermedades cardiovasculares, sino también de otras diversas patologías. Así, hemos demostrado que la sustitución de sacarosa de las dietas por un edulcorante natural a base de pinitol, ayuda a mejorar el metabolismo glucémico, así como la secreción de insulina en pacientes con intolerancia a la glucosa. Además, hemos visto que la introducción en la dieta de una bebida rica en ácidos grasos omega-3, ayuda a mejorar el metabolismo lipídico de voluntarios con sobrepeso, mientras que si incorporamos una bebida con fitoesteroles, ayudamos no solo a reducir los niveles de colesterol, sino que favorecemos la reducción del estado pro-inflamatorio característico de la obesidad.

Además, teniendo en cuenta que la obesidad se caracteriza por la acumulación de grasa en diferentes localizaciones del organismo, en esta tesis hemos analizado también la composición del tejido adiposo, y su papel en la patología cardiovascular. La acumulación de tejido adiposo visceral se ha asociado con un efecto más nocivo para el organismo que el tejido adiposo subcutáneo, y en esta tesis demostramos que se trata de un depósito de grasa mucho más rico en proteínas de oxidación, coagulación e inflamación que la grasa subcutánea. Corroborando el efecto protector asociado al tejido adiposo subcutáneo, demostramos también una mayor expresión de genes implicados en el proceso de angiogénesis en este tejido

comparado con la grasa visceral, en la que tan sólo aumentaba la vía del VEGF, no sólo en la grasa total, sino en las células madre (ASC) que esta contiene. Sin embargo, estas diferencias disminuyen ante la presencia otro factor de riesgo como es la diabetes.

Además, en esta tesis demostramos por primera vez la presencia de células madre en el tejido adiposo cardíaco, analizando sus propiedades en función de su localización. Distinguimos así entre el tejido adiposo epicardio acumulado en la zona del ápex (eWAT) y sus células derivadas eASC y tejido adiposo perivascular, que se acumula a lo largo de las arterias coronarias (PVAT) y sus células derivadas pASC. Aunque observamos una mayor velocidad de crecimiento en las eASC, demostramos que las pASC, que se encuentran más próximas a la arteria coronaria, poseen un mayor potencial angiogénico que las eASC, viéndose alterado en presencia de comorbilidades en el donante. Por último, en esta tesis exponemos la importancia de las partículas extracelulares (microvesículas y exosomas) secretadas al medio por las ASC, que producen un aumento en la velocidad de migración de las células endoteliales HMEC-1, convirtiéndose en una terapia emergente en el campo de la medicina regenerativa.

En resumen, en esta tesis analizamos la importancia de controlar y reducir los diferentes factores de riesgo cardiovascular, y como estos factores de riesgo afectan a la composición y funcionamiento del tejido adiposo, en función de la localización en la que este tejido se acumule. Además, proponemos la introducción de exosomas y microvesículas como sustitución a las células madre en el campo de la medicina regenerativa.

INTRODUCCIÓN

1. LAS ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) son un conjunto heterogéneo de enfermedades y trastornos que pueden afectar a los vasos sanguíneos y/o al corazón con etiología y localización diversas y que se ven afectadas por la combinación de diferentes factores de riesgo. Dada la complejidad y a la multitud de procesos que intervienen en patología cardiovascular, no existe una terapia única para su prevención o tratamiento, aunque sí está demostrado que la mayor parte de los eventos cardiovasculares están íntimamente relacionados con el estilo de vida y otros factores modificables. Por ello, y con el fin de reducir la cada vez mayor incidencia de enfermedades cardiovasculares, así como de mejorar el pronóstico de aquellos pacientes ya diagnosticados, han aparecido una serie de guías para la prevención de las ECV compuestas por una serie de directrices, dirigidas a cambiar ciertos hábitos de la vida así como la estandarización del uso de diversos fármacos que ayuden a reducir la aparición clínica de una enfermedad cardiovascular (F. Piepoli, 2017).

Según datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) las ECV constituyen la principal causa de muerte entre la población mundial (WHO, 2016). Se estima que en 2015, 17,7 millones de personas murieron a causa de una enfermedad cardiovascular, lo que representa un 31% de las muertes registradas. De acuerdo con el Instituto Nacional de Estadística, estos datos son muy similares a los observados en el territorio español, donde las enfermedades cardiovasculares causaron un total de 124.197 muertes en el año 2015, lo que corresponde a un 29% del número total de muertes (**Figura 1**) y un 80% de las enfermedades prematuras. Además, según datos de la Fundación Española del Corazón, las ECV suponen un gasto medio de 9.000 millones de euros en España y de 192.000

millones de euros en la Unión Europea, suponiendo un 7,1% del gasto sanitario total.

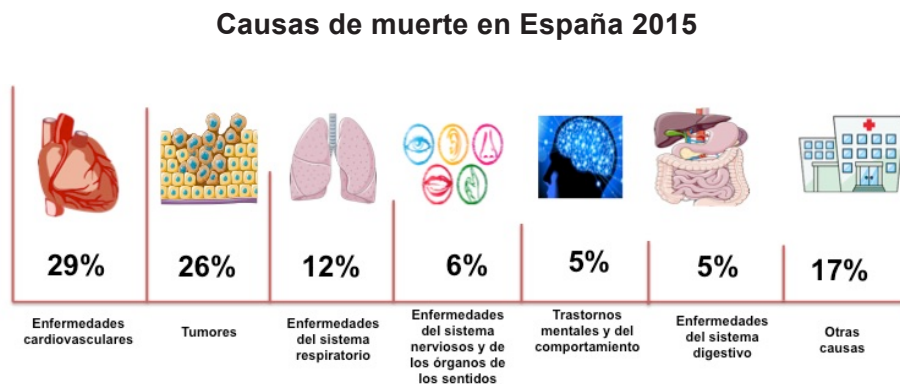


Figura 1. Causas de muerte en España durante el año 2015. Gráfico elaborado a partir de los datos publicados por el Instituto Nacional de Estadística (INE) (“INE (Instituto Nacional de Estadística),” 2017).

1.1 Tipos de enfermedades cardiovasculares

Entre las enfermedades cardiovasculares se incluyen las siguientes (**Figura 2**) (Mackay & Mensah, 2004):

Cardiopatía coronaria: Es una de las ECV más frecuentes. Se caracteriza por la oclusión de alguno de los vasos sanguíneos que irrigan el miocardio debido principalmente a una acumulación de lípidos o coágulos en las paredes vasculares.

Ictus: Consiste en una oclusión o ruptura de alguno de los vasos que irrigan el cerebro.

Disección o aneurisma aórtico: Consiste en la dilatación y rotura de la aorta.

Enfermedad arterial periférica: Es causada por alteraciones en las arterias que irrigan las extremidades.

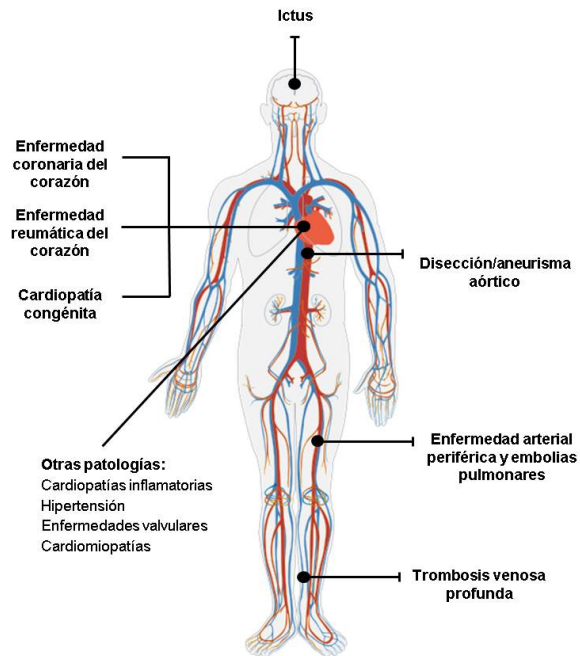


Figura 2. Caracterización y localización de las diferentes enfermedades cardiovasculares

Enfermedad reumática del corazón: Se trata de lesiones en el miocardio o en las válvulas cardiacas originadas por una infección bacteriana.

Cardiopatía congénita: Se trata de defectos o malformaciones genéticas o gestacionales del corazón.

Trombosis venosa profunda y embolias pulmonares: Estas dos patologías son causadas por la formación de un coágulo en las venas de las piernas, que pueden desprenderse y alojarse en los vasos del corazón o en los pulmones.

Otras enfermedades cardiovasculares: Existen otras enfermedades, más minoritarias que también están relacionadas con los vasos sanguíneos y el corazón como pueden ser las enfermedades valvulares, las cardiomiopatías inflamatorias o los tumores vasculares del cerebro y corazón entre otras.

1.2 La patología cardiovascular

La mayoría de las enfermedades cardiovasculares tienen lugar como causa subyacente la aparición del proceso de arterosclerosis. Esto ocurre principalmente en la cardiopatía isquémica, el accidente cerebrovascular y la arteriopatía periférica. Además, este proceso aterosclerótico suele ir acompañado por un estado inflamatorio que afecta a los vasos de mediano y gran calibre, dando así lugar a la patología cardiovascular (Domínguez, 2016).

1.2.1 Aterosclerosis

Se trata de una enfermedad crónica y progresiva, que afecta a las arterias de diferentes lechos vasculares y que se caracteriza por el engrosamiento de la capa íntima y media dando lugar a una pérdida de la elasticidad. Se produce una acumulación de lípidos, tejido fibroso y células inflamatorias que da lugar a la formación de una placa de ateroma produciendo un estrechamiento de la pared arterial, estenosis (**Figura 3**) y que puede complicarse con la rotura de la placa y la formación de un trombo en su superficie (trombosis), lo que facilita su crecimiento causando eventos isquémicos distales (Lahoz & Mostaza, 2007).

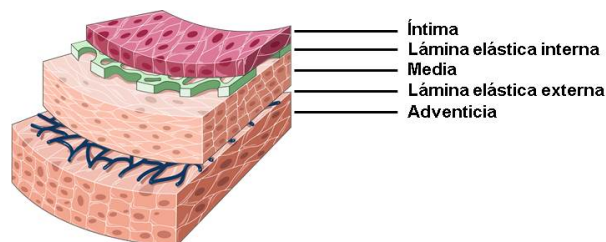


Figura 3. Estructura de la pared arterial. Del interior hacia el exterior del vaso encontramos la capa (o túnica) íntima (compuesta por células endoteliales y pericitos), la lámina elástica interna, la capa media (compuesta por células musculares lisas), la lámina elástica externa y la capa adventicia (compuesta principalmente por fibroblastos y la matriz extracelular).

La aterosclerosis se inicia en edades tempranas, de forma asintomática y se desencadena por factores tanto sistémicos como locales, dando lugar a un deterioro progresivo de la función vascular. Así, además del depósito lipídico en la pared del vaso, se sabe que la inflamación vascular, el estrés oxidativo, y la disfunción endotelial poseen un papel muy importante en la formación y desarrollo de la placa aterosclerótica (L. Badimon, Vilahur, & Padro, 2010; Ibanez, Vilahur, & Badimon, 2007).

1.2.2 Angiogénesis y vasculogénesis en la ECV

Durante años, un gran número de investigadores han centrado sus estudios en la presencia de neovasos en la lesión aterosclerótica. Estos microvasos proceden de la densa red *vasa vasorum* presente en la adventicia y que se muestra muy desarrollada durante la aterosclerosis. La angiogénesis y la vasculogénesis son los procesos responsables del desarrollo del sistema circulatorio en el desarrollo embrionario. En etapas posteriores, el proceso de angiogénesis está implicado en el desarrollo de diversas patologías, como son la artritis y el crecimiento tumoral, pero también tiene un papel terapéutico muy importante no sólo ayudando a la revascularización, sino que también produce una mejora del riego sanguíneo así como en la función del miocardio, por ello se considera que la angiogénesis es una de las terapias más prometedoras para las diferentes enfermedades cardiovasculares, principalmente las enfermedades isquémicas 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 (Rivard & Isner, 1998).

El proceso de vasculogénesis utiliza células madre o progenitoras, diferenciadas a células endoteliales, para la formación de los vasos. En cambio, el proceso de angiogénesis utiliza vasos preexistentes, a

partir de los cuales se generan nuevos vasos. En este proceso están involucrados un gran número de factores de crecimiento, así como diferentes tipos celulares (Demir, Seval, & Huppertz, 2007) (**Figura 4**).

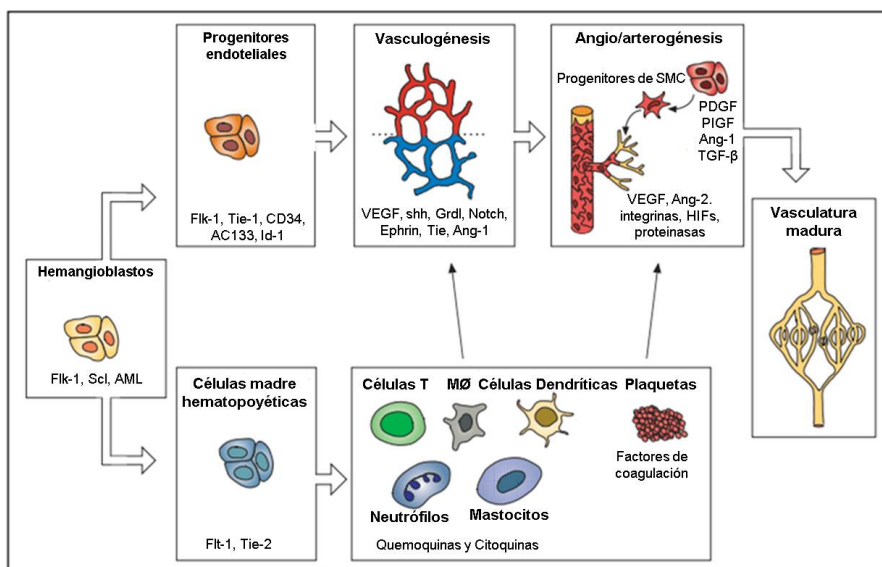


Figura 4. Esquema de la formación de la vasculatura madura. Los progenitores endoteliales se diferencian a células endoteliales arteriales o venosas, que se unen dando lugar a capilares primitivos. Estos capilares se ramifican y estabilizan gracias a la acción de las células musculares lisas. Además, las células hematopoyéticas se diferencian a leucocitos y plaquetas dando lugar a una contribución indirecta paralela al proceso de angiogénesis. Adaptada de (Carmeliet, 2003).

La angiogénesis patológica y la terapéutica comparten gran parte 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 (Carmeliet, 2003; Simons & Ware, 2003).

La angiogénesis es un proceso complejo, que requiere una regulación coordinada entre sus potenciadores e inhibidores, más conocidos

como factores pro- y anti-angiogénicos. Normalmente, el factor desencadenante de la angiogénesis es una situación de hipoxia, que suele venir acompañada con la inflamación del tejido y con un estrés oxidativo. En las células existen sensores de oxígeno, como el factor inducible de hipoxia-1 α (HIF-1 α), y factores de crecimiento que responden a estos estímulos (**Figura 5**).

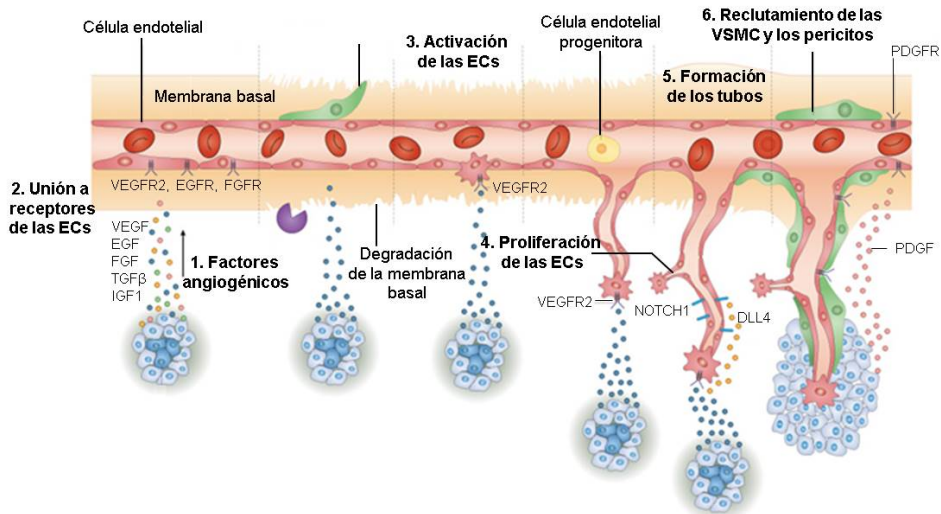


Figura 5. Etapas del proceso de angiogénesis. Imagen de Bio-Techne R&D systems.

En la primera fase del proceso angiogénico se produce una dilatación de capilares y vénulas quiescentes gracias a la expresión de varias citoquinas que aumentan la permeabilidad y activan las células endoteliales. A continuación se desencadena la degradación de la membrana basal por la acción de diversas enzimas proteolíticas, las metaloproteinasas de matriz (MMPs, del inglés, *matrix metalloproteinases*). En la segunda fase se produce la activación y migración de las células endoteliales, que invaden el tejido colindante y proliferan formando la estructura de la nueva vasculatura. Finalmente tiene lugar un reclutamiento de pericitos y células musculares vasculares lisas (VSMC, del inglés, *Vascular Smooth Muscle Cells*), que ayudan a la estabilización de los nuevos vasos formados. En este punto se crea la nueva membrana basal y la matriz

extracelular, se estrechan las uniones celulares y se induce de nuevo la quiescencia de los vasos, permitiendo así el paso del flujo sanguíneo (Carmeliet & Jain, 2000; Wietecha & DiPietro, 2013).

1.2.3 Inflamación

La inflamación es la respuesta del sistema inmunitario frente a una alteración, como puede ser una infección o una lesión. Existen dos tipos de respuesta inflamatoria, la respuesta aguda o innata y la respuesta crónica o adaptativa. Este proceso se inicia con infiltración de células heterogéneas inflamatorias así como la contribución de diversas enzimas que alteran el gradiente de quemoquinas produciendo una respuesta inflamatoria. La infiltración de estas células inflamatorias en la pared vascular juega un papel muy importante en el desarrollo de la enfermedad aterosclerótica. Tras el reclutamiento de estas células, se empieza a formar la placa aterosclerótica que crece por la interacción entre las células inmunitarias, las endoteliales, las plaquetas y las células musculares lisas, todo ello acompañado de un remodelamiento de la matriz extracelular. La principal diferencia entre la respuesta aguda o innata es la naturaleza de las células inflamatorias que aparecen en los tejidos dañados. Los neutrófilos son los primeros en llegar a la zona de lesión y son característicos de la respuesta inflamatoria aguda, mientras que la respuesta crónica incluye la presencia de monocitos y linfocitos (Bäck, Weber, & Lutgens, 2015; Golia et al., 2014).

2. FACTORES DE RIESGO CARDIOVASCULAR

Las ECV son consecuencia de la interacción entre factores genéticos y ambientales. Existen diversos estudios como el *Framingham Heart Study* (Dawber, Kannel, & Lyell, 1963) que han detectado diferentes condiciones que están relacionadas con la aparición de una enfermedad cardiovascular y cuya detección, permite modificarlos para prevenir el desarrollo de la enfermedad, o bien, si esto no es posible, detectar a los sujetos de alto riesgo cardiovascular (Wilson et al., 1998). El riesgo de sufrir un evento cardiovascular depende en gran medida de los llamados factores de riesgo cardiovascular (FRCVs), a mayor número de factores de riesgo, la probabilidad de sufrir un evento cardiovascular aumenta. Según datos del estudio “*Lifetime Risk Pooling Project*” (Benjamin et al., 2018), al estudiar a un grupo de pacientes de 55 años, se vio que aquellos varones blancos con 2 o más factores de riesgo cardiovascular tenían un riesgo del 26,6% de sufrir una ECV, comparado con aquellos que tenían menor número de factores de riesgo que tan solo tenían un riesgo del 4,0%. En cuanto a varones negros, el riesgo era de 27,9% comparado con un 9,9% respectivamente.

Los factores de riesgo cardiovasculares pueden dividirse en modificables y no modificables. Entre los factores de riesgo modificables se encuentran patologías como la diabetes, la hipertensión, la dislipidemia, la obesidad, y hábitos adquiridos como el tabaquismo y el sedentarismo. Respecto a los factores de riesgo no modificables destacan la edad, el sexo y la predisposición genética (McClelland et al., 2015; WHO, 2016). Además de los factores de riesgo clásicos citados, existen también nuevos factores de riesgo cardiovascular incluyendo moléculas que no habían sido relacionadas con la patología cardiovascular y factores asociados a cambios en el

estilo de vida (L. Badimon & Vilahur, 2012; Fundación Española del Corazón, 2011) (**Figura 6**).

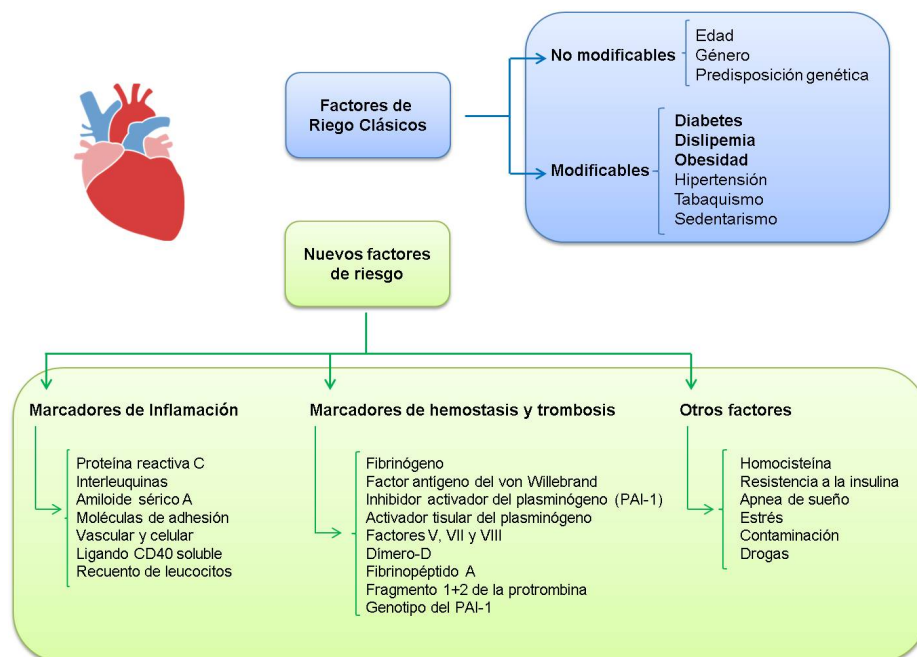


Figura 6. Clasificación de los factores de riesgo cardiovascular. Adaptada de (L. Badimon & Vilahur, 2012)

En esta tesis nos centraremos sobre todo en los siguientes factores de riesgo modificables: La obesidad, la dislipemia y la diabetes.

2.1 Obesidad

La obesidad es una enfermedad crónica y compleja que se produce cuando un individuo ingiere más nutrientes de los que necesita, de forma que se produce una acumulación de grasa excesiva o hipertrofia del tejido adiposo en el cuerpo, es decir, cuando la reserva natural de energía almacenada en forma de grasa corporal se incrementa hasta un punto tal que empieza a asociarse con numerosas complicaciones y comorbilidades, incluyendo un

incremento de la mortalidad. Algunas de las principales patologías asociadas a la obesidad pueden ser la aparición de enfermedades cardiovasculares, enfermedades óseas o de las articulaciones e incluso el aumento de la probabilidad de padecer diversos cánceres (endometrio, mama, ovarios, próstata, hígado, vesícula biliar, riñones y colon) (Arnold, Renehan, & Colditz, 2017; Must et al., 1999; Ray, Bhattacharya, & De, 2017). La obesidad tiene diversas causas, siendo los factores sociales, culturales, metabólicos y genéticos los más importantes, que condicionan su tratamiento de forma decisiva. Se trata de un trastorno que se inicia en la infancia y progresa en la edad adulta dando lugar diversos problemas de salud (Must et al., 1999; Ray et al., 2017).

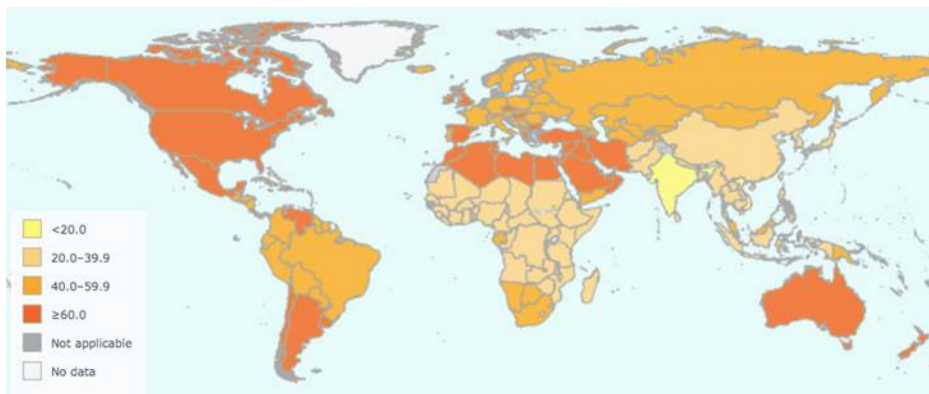


Figura 7. Mapa mundial de la prevalencia (%) de obesidad y el sobrepeso en adultos mayores de 18 años en 2017 de la Organización Mundial de la Salud (WHO, 2017).

La obesidad es una de las grandes epidemias del siglo XXI afectando a un gran número de países, no sólo a países desarrollados, sino que también afecta a países en vías de desarrollo (**Figura 7**). Según datos de la OMS, en 2016 un 39% de la población sufría sobrepeso y un 13% obesidad (11% en hombres y 15% en mujeres), lo cual representa un aumento de la obesidad de un 3% desde 1975. Además, se ha observado en los últimos años un importante aumento en la prevalencia de la obesidad infantil (Poskitt, 2014). Esta tendencia

al alza en las cifras de obesidad ha llevado a que, junto con el hambre, la desnutrición y las enfermedades infecciosas, la obesidad sea considerada como una de las mayores amenazas sanitarias de los últimos años. En Europa la situación es similar, con una alta variación en los niveles de obesidad y sobrepeso dependiendo del nivel de desarrollo del país, se estima que alrededor de un 50% de la población europea sufre sobrepeso y alrededor del 20% sufre obesidad (WHO, 2017).

Para clasificar a un individuo en función de su peso pueden utilizarse varias medidas, la circunferencia de la cintura o la cadera, la relación cintura/cadera, el ratio peso-altura, o la más utilizada, el índice de masa corporal $IMC = \frac{Peso (Kg)}{altura(m^2)}$. Se define sobrepeso a un IMC entre 25 y 30kg/m² y se considera obesidad un IMC ≥ 30 kg/m² (Tabla 1) (Klein et al., 2004; Litwin, 2008)

Tabla 1. Clasificación internacional de los adultos según su IMC.

Clasificación	IMC (kg/m ²)
Infrapeso	< 18.50
Delgadez severa	<16.0
Delgadez moderada	16.00 – 16.99
Delgadez leve	17.00 – 18.49
Peso normal	18.5 – 24.99
Sobrepeso	25.00 – 29.99
Obesidad	> 30.00
Obesidad tipo I	30.00 – 34.99
Obesidad tipo II	35.00 – 39.99
Obesidad tipo III	≥ 40.00

IMC; Índice de masa corporal. Adaptada de la OMS (WHO, 2017).

El efecto de la obesidad en la enfermedad cardiovascular no es sólo debido a su papel como factor de riesgo clave en el desarrollo de la enfermedad arteriosclerótica y la enfermedad coronaria, sino que junto a la diabetes, es uno de los componentes principales del síndrome metabólico y ejerce una gran influencia sobre otros factores de riesgo como son la hipertensión arterial y la dislipidemia (Grundy et al., 2005;

Hubert, Feinleib, McNamara, & Castelli, 1983; Reisin & Alpert, 2005). La importancia de la obesidad radica en que el tejido adiposo de un órgano endocrino, es capaz de sintetizar y liberar una gran cantidad de moléculas a la sangre que afectan a la homeostasis cardiovascular, como son la interleucina-6 (IL-6), la adiponectina, el factor alfa de necrosis tumoral (TNF- α) y el inhibidor-1 del activador del plasminógeno (PAI-1) (Hotamisligil, Arner, Caro, Atkinson, & Spiegelman, 1995; Lundgren, Brown, Nordt, Sobel, & Fujii, 1996; Steppan et al., 2001; Wajchenberg, 2000). Diversos estudios demuestran la relación entre el aumento de peso corporal con un incremento de la presión sistólica y la presión diastólica que se traducen en un mayor riesgo de sufrir una enfermedad coronaria, es más, un aumento de una unidad en el BMI se relaciona con un incremento del 4% del riesgo de sufrir un ictus isquémico y un 6% en el caso del ictus hemorrágico (Kurth et al., 2002; Poirier et al., 2006). Según datos del estudio INTERHEART, realizado en 2004 sobre 30.000 pacientes de 52 países diferentes, representando a los 5 continentes, se observó que la obesidad era uno de los factores de riesgo modificables con mayor peso en el desarrollo del infarto de miocardio, y además se confirmó la importancia de la adiposidad abdominal como factor de riesgo *per se* del infarto agudo de miocardio (Yusuf et al., 2004).

Sin embargo, no todos los individuos que padecen obesidad o sobrepeso padecen también una enfermedad cardiovascular, es más, se ha visto que en pacientes con sobrepeso u obesidad moderada existe una menor incidencia de enfermedades cardiovasculares y una menor mortalidad. El fenómeno por el cual la obesidad pueda estar asociado tanto con un efecto perjudicial como beneficioso, se conoce como “la paradoja de la obesidad” (Amundson, Djurkovic, & Matwiyoff, 2010; Schetz et al., 2019). Esto es debido, como veremos más

adelante, a la diferente composición y funcionalidad del tejido adiposo en función de su localización (Jensen, 2008).

2.3 Dislipemia

Se define dislipemia como una concentración anormal de lípidos en la sangre. Niveles altos de colesterol LDL (cLDL), así como de triglicéridos (TG), o una reducción en los niveles de colesterol HDL (cHDL), están directamente relacionados con el aumento de riesgo de sufrir una enfermedad cardiovascular (Miller, 2009). Se trata de una alteración que puede ser genética, como es el caso de la hipercolesterolemia familiar, o que se desarrolla a lo largo de los años, la dislipidemia adquirida.

Las lipoproteínas son unas estructuras formadas por fosfolípidos y proteínas que ayudan al transporte de los lípidos en el torrente circulatorio. Las lipoproteínas están compuestas por un núcleo hidrofóbico, formado por ésteres de colesterol (CE, del inglés, *cholesterol esters*) y TG, que se encuentra rodeado por una capa superficial hidrofílica, formada por colesterol libre, o no esterificado (FC, del inglés, *free cholesterol*), fosfolípidos y proteínas, principalmente apolipoproteínas, que dan integridad a la estructura (**Figura 8**) (Ridker, 2014).

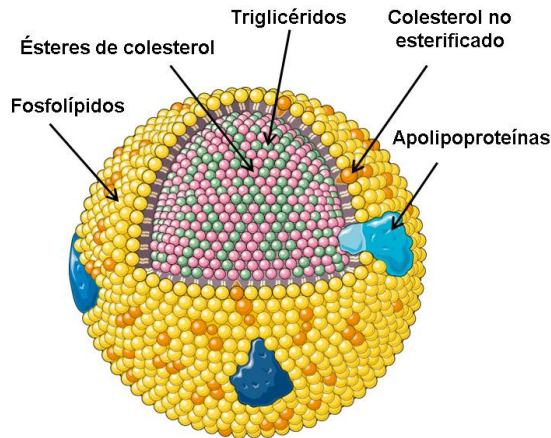


Figura 8. Estructura general de las lipoproteínas.

Las lipoproteínas se pueden dividir en varias clases basándose en su tamaño y composición lipídica; quilomicrones, VLDL (lipoproteínas de muy baja densidad; del inglés, *very low density lipoproteins*), IDL (lipoproteínas de densidad intermedia; del inglés, *intermediate low density lipoproteins*), LDL (lipoproteínas de baja densidad; del inglés, *low density lipoproteins*), y HDL (lipoproteínas de alta densidad; del inglés, *high density lipoproteins*) (Feingold & Grunfeld, 2015) (Tabla 2).

Tabla 2. Características y composición de las lipoproteínas.

	Tamaño (nm)	Densidad (g/ml)	Lípidos %	TG %	Fosfolípidos %	Colesterol Total %	Proteínas %
Quilomicrón	75/1200	≤ 0.98	98-99	85-90	7-9	4-8	1-2
VLDL	30-80	0.98-1.006	85-90	55	15	20	10-15
IDL	25-35	1.006-1.019	75-80	25	15-20	35	15-20
LDL	18-25	1.019-1.063	75	10	20	45	25
HDL	5-15	> 1.063	50	5	25	20	50

VLDL: Lipoproteínas de muy baja densidad; IDL: Lipoproteínas de intensidad intermedia; LDL: Lipoproteínas de baja densidad; HDL Lipoproteínas de alta intensidad; TG: Triglicéridos

2.3.1 Colesterol-HDL

Las primeras asociaciones del cHDL y la enfermedad coronaria surgieron en el “*Framingham Heart Study*” (Kannel, Dawber, Friedman, Glennon, & Mcnamara, 1964), cuando se empezó a hablar del cHDL como “*colesterol bueno*”. Los efectos beneficiosos del cHDL se atribuyeron en un primer momento al transporte reverso del colesterol, es decir, al transporte del colesterol de los macrófagos y otras células sanguíneas al hígado para su eliminación (Barter & Rye, 1996). Años después, Badimon et. al. pusieron en práctica este concepto de colesterol bueno, viendo que, al administrar HDL a conejos, se producía una inhibición de la aterosclerosis (J. J. Badimon, Badimon, & Fuster, 1990). A su vez, se vio que aquellos animales que sobre expresaban la apolipoproteína-I (APO-AI), proteína mayoritaria de las HDL, se consigue también una protección ante la aterosclerosis. Otras propiedades importantes de las HDL incluyen la estimulación de células endoteliales progenitoras para la reparación celular y la modulación de la respuesta inmunitaria. Además, poseen efecto anti-trombótico, anti-inflamatorio y anti-oxidante. Es por tanto que el cHDL, así como las apolipoproteínas que lo componen, pueden considerarse un buen marcador para predecir el riesgo cardiovascular (L. Badimon & Vilahur, 2012; Rader & Hovingh, 2014).

Transporte reverso del colesterol: Como se ha citado previamente, el transporte reverso del colesterol (TRC) es una de las principales vías de acción de las HDL. Este consiste en captar el colesterol proveniente de los diferentes tejidos del organismo y su transporte al hígado para su posterior eliminación. El TRC comienza con la producción en el hígado y el intestino de las HDL nacientes, ricas en ApoA-I, que extraen el FC de las membranas celulares y lo esterifica gracias a la acción de la enzima LCAT (Lecitín Colesterol Acil

Transferasa), dando lugar unas partículas de HDL, cada vez de mayor tamaño y más ricas en CE; primero las HDL-3, y posteriormente las HDL-2. En este punto, el CE puede llegar al hígado por dos vías; I) Directamente desde las HDL-2, mediante la unión de las moléculas de CE a los receptores SR-BI; y II) Mediante el paso intermedio de las VLDL y las LDL y la posterior unión de los CE a los receptores de las LDL (LDL-R). Una vez eliminadas las partículas de CE por el ácido biliar, las moléculas de Apo A-I son de nuevo liberadas dando lugar a un nuevo ciclo de TRC (Daniels, Killinger, Michal, Wright, & Jiang, 2009; Errico et al., 2013; Martínez Triguero, Veses Martín, Garzón Pastor, & Mijares, 2012) (**Figura 9**).

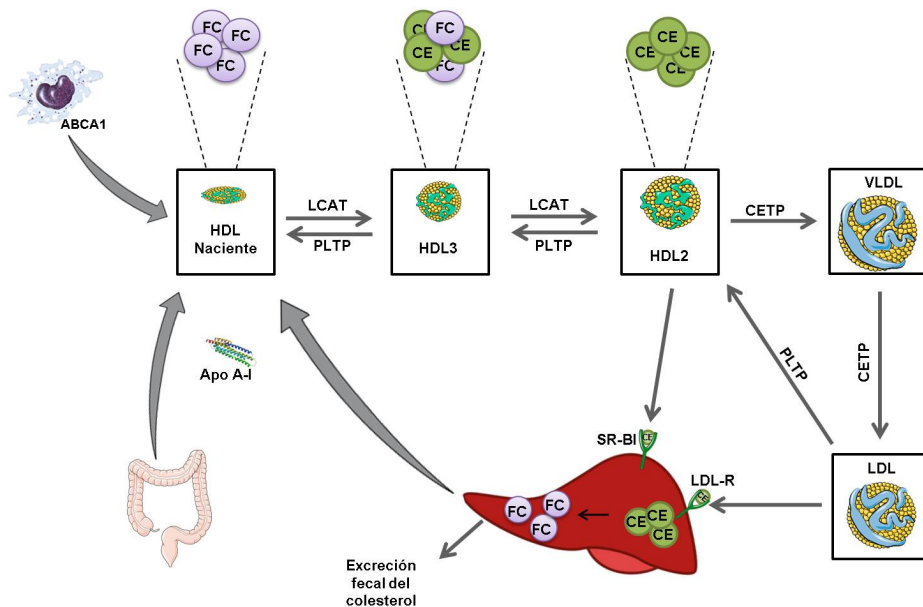


Figura 9. Esquema general del metabolismo de las lipoproteínas.

2.3.2 Colesterol-LDL

También conocido como “*colesterol malo*”. Diversos estudios constatan que, un aumento en los niveles de cLDL está directamente asociado con un aumento del riesgo de sufrir un infarto de miocardio y de la muerte vascular. Además, se sabe que el cLDL es un agente

causal del inicio y progresión de la placa arteriosclerótica (Ridker, 2014).

2.3.3 Triglicéridos

Hace años que se asocian altos niveles de TG con un mayor riesgo cardiovascular, aunque el modo en el que estos actúan siempre ha causado gran controversia. Los TG, al contrario que el colesterol, son degradados con gran facilidad por las células y por tanto, este colesterol que proviene de las lipoproteínas ricas en TG (colesterol remanente) penetra en la íntima, dando lugar a un proceso de inflamación, así como a la formación de la placa aterosclerótica y finalmente a la ECV (Nordestgaard & Varbo, 2014; Varbo & Nordestgaard, 2016) (**Figura 10**).

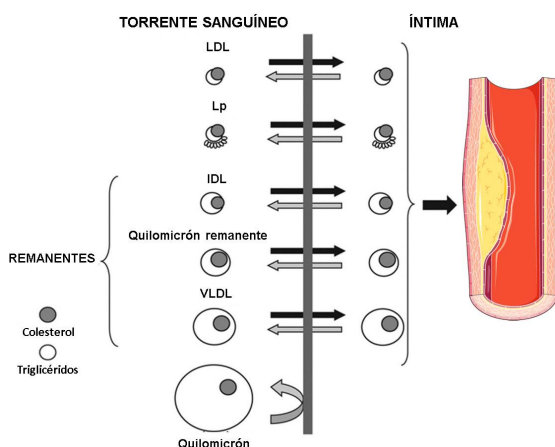


Figura 10. Mecanismo de entrada de las lipoproteínas en la pared arterial y formación de la placa aterosclerótica. Las moléculas de mayor tamaño como son los quilomicrones o las HDL no logran atravesar la pared y por tanto no dan lugar a la formación de placa aterosclerótica. Imagen adaptada de Nordestgaard and Varbo (Varbo & Nordestgaard, 2016).

2.3.4 Tratamiento farmacológico

De acuerdo con las guías clínicas actuales, la primera estrategia utilizada para la reducción de los niveles de cLDL y por tanto reducir el riesgo cardiovascular asociado, son la dieta y el ejercicio, aunque

suelen ir acompañados de un tratamiento farmacológico, habitualmente las estatinas, que bloquean la síntesis de colesterol, al inhibir la hydroxyl-methyl-glutaryl-coenzima-A (HMG-CoA) reductasa, reduciendo el riesgo cardiovascular entre un 20 y un 30% (Goldstein & Brown, 2016). Sin embargo, ante la necesidad de buscar nuevos fármacos capaces de sustituir a las estatinas cuando estas no son suficientes para conseguir una bajada de los niveles de cLDL, en el año 2003, se descubrió el enzima *proprotein convertase subtilisin/Kexin 9* (PCSK-9), un inhibidor de los receptores de las LDL (LDL-R). Los inhibidores de PCSK-9 impiden la degradación de los LDL-R, lo cual se ha observado que ayuda a reducir los niveles de cLDL, convirtiéndose en una buena alternativa al uso de estatinas (Gupta, 2015). Terapias combinadas de estatinas e inhibidores del PCSK9 logran reducir los niveles de cLDL en hasta un 60% (Sabatine et al., 2017) (**Figura 11**).

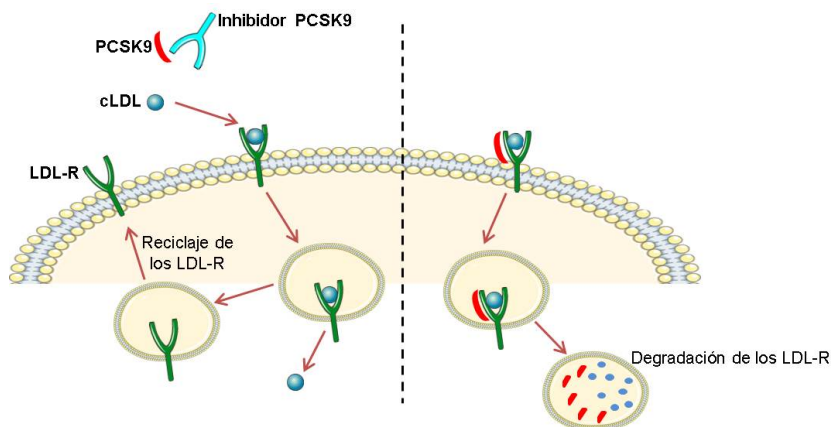


Figura 11. Mecanismo de actuación de los inhibidores del PCSK9.

Otra alternativa para reducir el riesgo cardiovascular consiste en aumentar los niveles de cHDL. Se sabe que un aumento del cHDL de 6,5 mg/dl conlleva una reducción del 8% del riesgo cardiovascular, mientras que la reducción de 6,5 mg/dl de cHDL implica un aumento del 11% de sufrir un evento cardiovascular (Santos-Gallego & Badimon, 2012). Igual que ocurría con la reducción del cLDL, existen

intervenciones no farmacológicas que ayudan al aumento de los niveles de cHDL. Por ejemplo, la práctica frecuente de ejercicio consigue aumentar los niveles de cHDL en hasta un 5%, el cese del hábito del tabaquismo permite un aumento del cHDL de 5mg/dl, la pérdida de peso en pacientes obesos implica un aumento de 0,35mg/dl de cHDL por cada kilogramo perdido. El consumo moderado de alcohol, entre 30 y 40 g diarios aumenta los niveles de cHDL entre un 5 y un 15%. Además, dietas ricas en ácidos grasos mono- y poliinsaturados (aceite de oliva, pescado azul, frutos secos...) ayudan también a reducir el riesgo cardiovascular, por el contrario el consumo de ácidos grasos saturados (ácido palmítico, ácido esteárico, la mantequilla...) reduce el poder antiinflamatorio del cHDL aumentando así el riesgo cardiovascular (Badimón, Santos-Gallego, & Badimón, 2010). Sin embargo, diversos estudios divergen sobre el alcance del efecto protector del cHDL, así como de la utilidad de terapias que ayuden a aumentar el cHDL como estrategia para la prevención de la ECV (Landmesser, 2012; Woudberg et al., 2018), ya que se ha visto que algunos de los efectos beneficiosos de las HDL aisladas de pacientes sanos no son reproducibles cuando estas son aisladas de pacientes diabéticos, o que han sufrido alguna patología cardiovascular (Besler et al., 2011).

2.2 Diabetes

La diabetes es una enfermedad crónica degenerativa (Nathan, 2015) caracterizada por la hiperglicemia y que es causada por el defecto en la secreción o acción de la insulina, o por una combinación de ambos (American Diabetes Association, 2011). Los cambios en cuanto al estilo de vida que la población está sufriendo en los últimos años, especialmente la incorporación de alimentos y dietas ricas en grasas y la falta de ejercicio físico han provocado un incremento dramático del

desarrollo de esta enfermedad a nivel mundial, convirtiéndose en una epidemia en los últimos años y siendo por tanto uno de los mayores retos en cuanto salud actualmente, no sólo por su impacto sobre el paciente, sino también en los sistemas sanitarios y la sociedad en general (Hossain, Kawar, & El Nahas, 2007).

Se ha demostrado que los pacientes con diabetes tienen una incidencia de ECV mucho mayor respecto a los que no lo son; esta incidencia se multiplica por 2 en el caso de los hombres y por 3 en el caso de las mujeres (Kannel & McGee, 1979).

Según datos de la Federación internacional de diabetes (IDF, del inglés; *Intrnational diabetes federation*) el 9% de los adultos tienen diabetes, concentrándose principalmente en países con ingresos medios y bajos (**Figura 12**). La IDF estima que en el año 2045 estas cifras se incrementarán llegando a los 9.500 millones de afectados, lo que se traduce en un 9,9% de la población mundial (International Diabetes Federation (IDF), 2017).

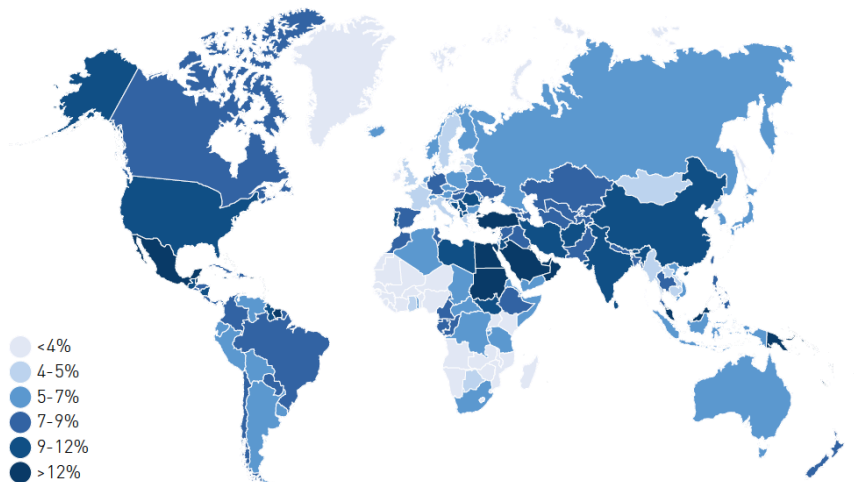


Figura 12. Mapa mundial de la estimación de prevalencia de diabetes ajustada por la edad (20-79 años) en 2017 de la Federación Internacional de Diabetes (International Diabetes Federation (IDF), 2017).

En Europa la situación es representativa de lo que ocurre a nivel mundial. Se calcula que el 8.8% de los adultos en este continente padecen esta enfermedad, con una distribución desigual, siendo Turquía el país con mayor incidencia de diabetes, enfermedad que afecta al 12.1% de la población, comparado con Irlanda donde la DM afecta tan solo al 4.3% de la población (International Diabetes Federation (IDF), 2017). En el caso de España la incidencia de esta enfermedad es superior a la media, afectando a un 10,4% de la población. Además, según datos del estudio *Di@betes*, se reflejó que casi la mitad de los afectados, el 6% de los casos, desconocían que padecían esta patología (Cabezas-Agrícola, 2017).

La diabetes puede subclasificarse según la OMS dependiendo de las causas e incidencia, existiendo principalmente tres tipos de diabetes: diabetes tipo 1 (DM-1), diabetes tipo 2 (DM-2) (**Figura 13**) y la diabetes gestacional (DMG), siendo la DM-2 la forma más prevalente de diabetes (Jaacks, Siegel, Gujral, & Narayan, 2016). La DM-1 se caracteriza por la destrucción inmunológica de las células beta del páncreas, encargadas de la producción de insulina (Atkinson & Eisenbarth, 2001). Los pacientes con DM-2 se caracterizan por una secreción deficiente de insulina por parte de las células beta del páncreas y una disminución de la glucosa disponible en los tejidos. Habitualmente, al desarrollo de DM-2 le precede una resistencia a la insulina que suele estar acompañada con otros factores de riesgo como la dislipidemia, la hipertensión y factores protrombóticos (Eckel, Alberti, Grundy, & Zimmet, 2010; Grundy et al., 2005; Mohammadi et al., 2017; Reisin & Alpert, 2005).

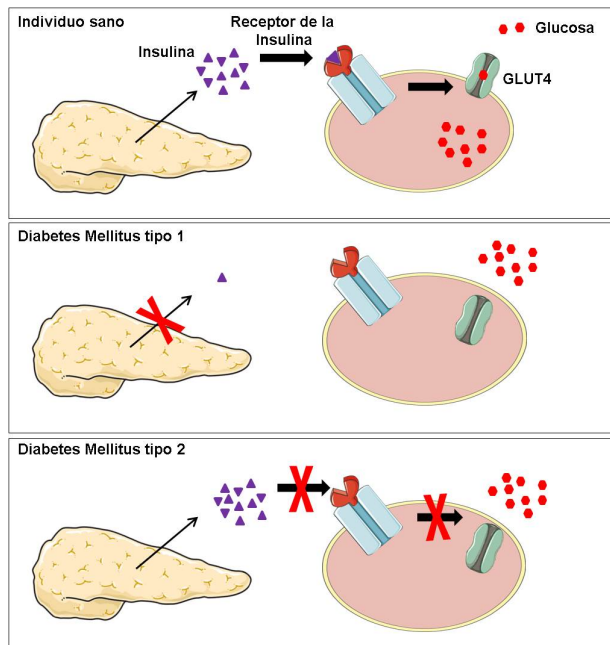


Figura 13. Mecanismo de actuación de los diferentes tipos de diabetes.

2.2.1 El síndrome metabólico

La definición de síndrome metabólico (MetS) varía en función de las diversas organizaciones y grupos de expertos que analicen el problema, lo que está consensuado que el MetS implica una acumulación de desajustes metabólicos que produce en los sujetos afectados un aumento del riesgo de sufrir entre otras enfermedades, diabetes mellitus tipo 2 y enfermedades cardiovasculares (Reisin & Alpert, 2005). Entre estos desajustes metabólicos se encuentran la hipertrigliceridemia, hipertensión, reducción de los niveles de cHDL, la obesidad (en especial la obesidad central) y la resistencia a la insulina. Según la *IDF*, se ha determinado que la presencia de al menos 3 de los siguientes factores de riesgo es suficiente para diagnosticar el MetS: perímetro de cintura ≥ 102 cm en los varones o ≥ 88 cm en las mujeres; TG ≥ 150 mg/dl (1.69 mmol/l); cHDL < 40 mg/dl (1.04 mmol/l) en hombres o 50 mg/dl (1.29 mmol/l) en mujeres; presión arterial sistólica/diastólica $\geq 130/85$ mmHg ; glucosa en

ayunas ≥ 100 mg/dl (5.6 mmol/l) o un tratamiento farmacológico para alguno de estos parámetros (Calabuig et al., 2017; Mohammadi et al., 2017). Los principales factores de riesgo para el desarrollo del MetS son la inactividad física y las dietas ricas en grasas y carbohidratos (Figura 14).

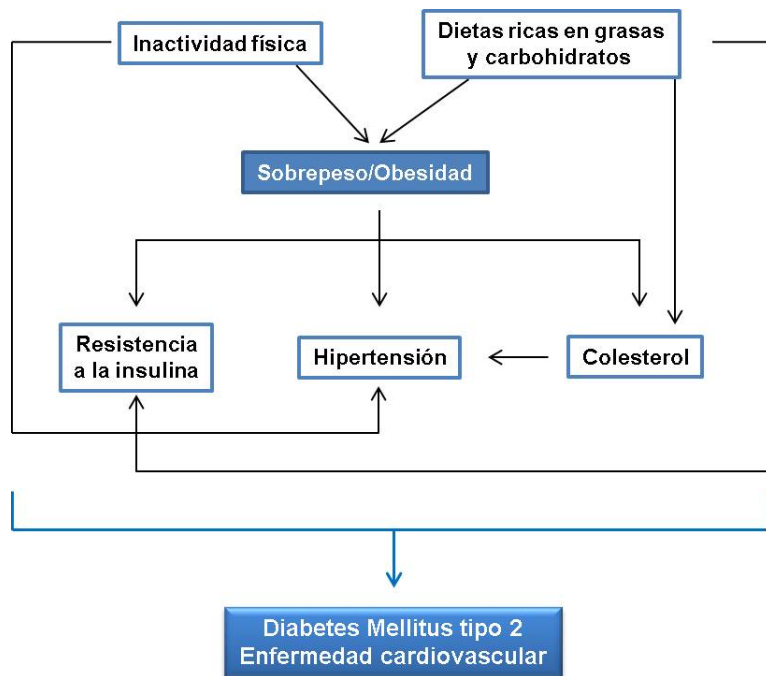


Figura 14. Principales factores de riesgo del síndrome metabólico. Adaptada a partir de (O'Neill & O'Driscoll, 2015).

3. PREVENCIÓN DE LAS ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES

El riesgo de mortalidad cardiovascular ha ido disminuyendo en los últimos años gracias a los avances terapéuticos que han tenido lugar. Aun así, la incidencia de las ECV es cada vez mayor debido al envejecimiento de la población, así como a la necesidad de un mayor control de los factores de riesgo y de una mayor prevención y concienciación social. En este aspecto, unos hábitos de vida saludables pueden ayudar a la prevención de la aparición de una enfermedad cardiovascular, incluyendo una dieta sana y variada y una actividad física regular (L. Badimon et al., 2010; Banegas, Villar, Graciani, & Rodríguez-Artalejo, 2006).

Un ejemplo de plan estratégico para la prevención cardiovascular tuvo lugar en Finlandia, país que en la época de los 1960s tuvo las mayores tasas mundiales de muerte por enfermedad cardiovascular (Puska, Laatikainen, Korpelainen, & Vartiainen, 2016). Mediante estrategias de educación sanitaria (creación de programas para perder peso y dejar de fumar en los lugares de trabajo, creación de series de TV que fomentaban hábitos de vida saludables, educación escolar, ley antitabaco, etc.), así como la creación de acuerdos con la industria del consumo para reducir niveles de sal y grasa en los alimentos, así como el etiquetaje de los alimentos, se consiguió una importante reducción en la mortalidad causada no solo por ECV, sino también otras enfermedades crónicas como puede ser el cáncer (Pekkanen, Nissinen, Puska, Punsar, & Karvonen, 1989).

De esta forma, las *Guías Europeas Para La Prevención De La Enfermedad Cardiovascular En La Práctica Clínica* recomiendan una serie de estrategias de prevención primaria destinadas a lograr cambios en el estilo de vida (mejora de la dieta, evitar el abuso de

alcohol y tabaco, aumento del ejercicio físico, etc.) para así reducir la incidencia de enfermedades en la población (Massimo et al., 2017).

3.1 Importancia de la nutrición en la enfermedad cardiovascular

La modificación de la dieta es la primera estrategia para la prevención y el tratamiento de las enfermedades cardiovasculares.

Fue en los años 60 cuando Ancel Keys se empezó a preguntar porque la tasa de infartos en hospitales de diferentes países era tan variable. Por ello, analizó la sangre de varios pacientes de un hospital de Italia y lo comparó con pacientes de Estados Unidos y descubrió que los niveles de colesterol eran muy diferentes entre ambos, por lo que supuso que el colesterol tenía un papel causal en el infarto de miocardio (Keys, 1961). Además comparó los hábitos alimenticios en ambas regiones, e incluyendo otros países en el proyecto nombrado “*Seven counties study*” (del inglés, estudio de los siete países) (Keys, 1994). Se empezó así a estudiar como la relación entre la dieta, los hábitos de vida y los factores ambientales podían afectar a la diferente incidencia de las ECV.

Igualmente, con la introducción de la dieta mediterránea, basada en el uso del aceite de oliva como principal fuente de grasa, así como en el mayor consumo de frutas, verduras y pescados en comparación con el consumo de carnes y dulces, se demostró como unos buenos hábitos alimenticios estaban íntimamente relacionados con el descenso de diversas patologías, como son las enfermedades cardiovasculares y el cáncer, remarcando así la importancia de una buena alimentación para prevenir la aparición de multitud de enfermedades (Carlos et al., 2018). El consumo regular de aceite de oliva, ayuda a la reducción de la enfermedad cardiovascular mediante la reducción de la presión

arterial, la mejora en el perfil lipídico, la función endotelial, la inflamación y la trombosis, así como factores relacionados con el síndrome metabólico como son la obesidad y la diabetes (Buckland & Gonzalez, 2015).

3.2 Ácidos grasos Omega-3

Lo ácidos grasos omega-3 (ω -3) son ácidos grasos poliinsaturados derivados del ácido linoléico y que son esenciales para el organismo. Los principales ácidos grasos ω -3 incluidos en la dieta son, el ácido alfa-linoléico, el ácido eicosapentanoico, el ácido docosapentanoico y el ácido docosahexaenoico (**Figura 15**). Se caracterizan por tener un doble enlace o insaturación en el tercer o sexto carbono respectivamente (Innis, 2014).

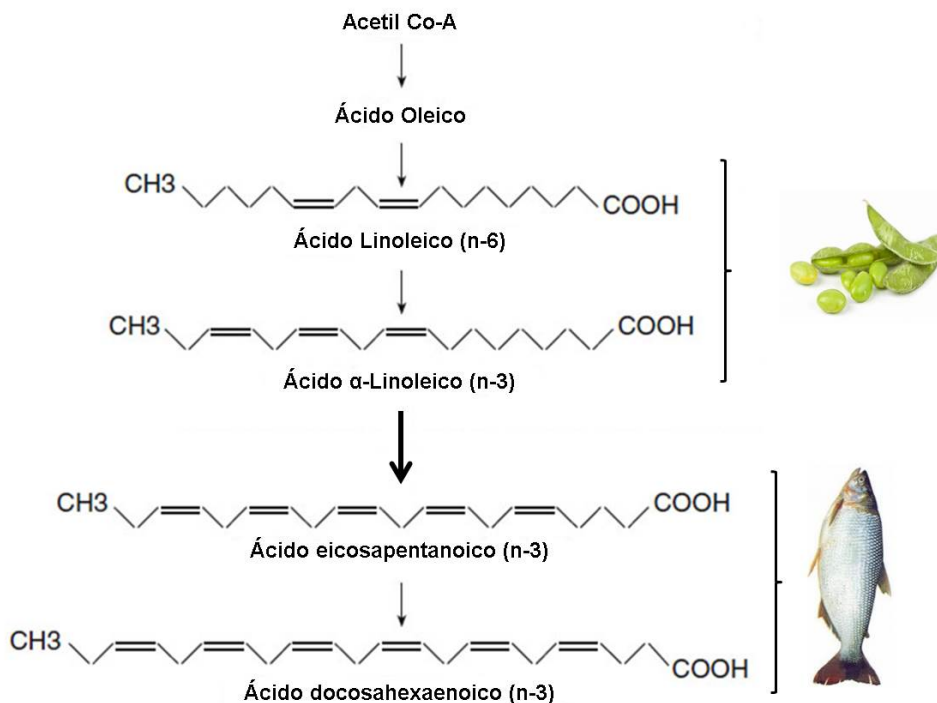


Figura 15. Clasificación y origen de algunos de los ácidos grasos poliinsaturados más comunes de la dieta. El ácido linoleico (ω -6) y el ácido α -linoleico (ω -3) tienen origen

vegetal, en cambio el ácido eicosapentanoico (ω -3) y el ácido docosahexaenoico (ω -3) poseen un origen animal, principalmente del pescado.

El ácido palmítico es un ácido graso saturado de cadena larga, es el ácido graso mayoritario en las dietas occidentales y ha sido directamente relacionado con la patología CV debido a su relación con el desarrollo de resistencia a la insulina e intolerancia a la glucosa, alteraciones metabólicas relacionadas no sólo con la diabetes, sino también con el desarrollo de la obesidad, por lo que la sustitución de este ácido graso por otros más beneficiosos ha cobrado una gran importancia en los últimos años (Snook, Park, Williams, Tsai Y-H, & Lee, 1999). La relación entre la ingesta de ω -3 y el riesgo de sufrir un evento CV empezó a estudiarse ya en los años 70. A día de hoy se sabe que las dietas enriquecidas en ácidos grasos ω -3 procedentes de plantas y pescado, poseen propiedades anti-inflamatorias, anti-arrítmicas, anti-trombóticas, ayudan a reducir la presión arterial, mejoran el perfil lipídico de la sangre, y retardar el crecimiento de la placa aterosclerótica entre otros efectos beneficiosos. Además, los ácidos grasos ω -3 se han asociado con una reducción de los niveles de TG (Jain, Aggarwal, & Zhang, 2015; Padro et al., 2015).

3.3 Fitoesteroles

Los fitoesteroles (PhyS, del inglés, *Phytosterols*) son componentes naturales de las plantas, no nutritivos y que poseen una estructura similar al colesterol, excepto por la cadena lateral (**Figura 16**). No son sintetizados por el organismo, sino que han de ser incluidos en la dieta. Las principales fuentes de PhyS son los aceites vegetales, margarinas, panes, cereales y verduras. Una dieta normal incluye entre 200 y 400 mg de los diferentes PhyS al día, aunque esta cantidad puede incluso doblarse en dietas específicas como la dieta vegetariana o la dieta japonesa, así como por la ingesta de

suplementos alimentarios ricos en PhyS. El consumo de estas dietas ricas en PhyS ayuda a reducir los niveles de cLDL, ya que actúa como un inhibidor competitivo de la absorción del colesterol (Gylling & Simonen, 2015; Weingärtner, Böhm, & Laufs, 2009).

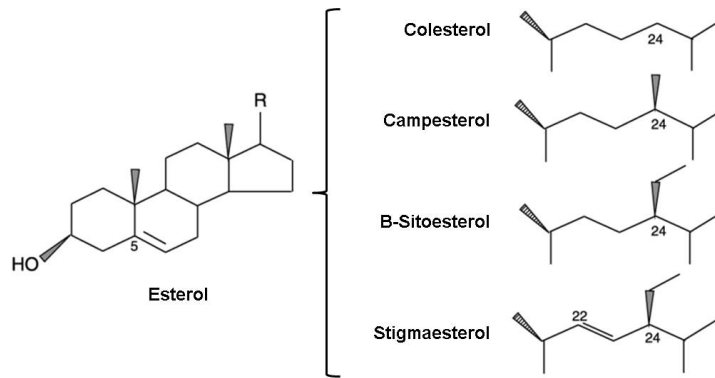


Figura 16. Estructura del colesterol y de los principales fitoesteroles encontrados en las plantas.

En el año 2001, el NCEP (del inglés, *National Cholesterol Education Program Expert Panel*) recomendó el uso de alimentos enriquecidos en PhyS como una estrategia óptima para la prevención primaria y secundaria de las ECV. La dosis recomendada de PhyS para reducir los niveles de cLDL y así reducir el riesgo de padecer un evento cardiovascular es de 2 mg al día. Aun así, se ha visto que dosis mayores no conducen a una mayor mejora del perfil lipídico (Racette et al., 2010).



4. EL TEJIDO ADIPOSEO

El tejido adiposo (TA) se encuentra ampliamente distribuido por todo el organismo y constituye entre el 15 y el 20% del peso corporal de los hombres, entre el 20 y el 25% del de las mujeres. Se trata de un tejido con mucha plasticidad, ya que puede aumentar hasta 10 veces su tamaño, llegando a constituir hasta el 40% del peso corporal en individuos obesos (L. Badimon, Oñate, & Vilahur, 2015; E. Chang, Varghese, & Singer, 2018; Corvera & Gealekman, 2014). El TA ha sido ampliamente estudiado como depósito de energía en el organismo, así como de barrera de protección de determinados órganos. Sin embargo, en los últimos años ha cobrado importancia su papel como tejido endocrino, así como su papel como reservorio de células madre (Kershaw & Flier, 2004). Inicialmente, se consideraba que la principal fuente de células madre mesenquimales (MSC; del inglés, *Mesenchymal stem cells*) venía de la médula ósea, sin embargo, se ha visto que en el tejido adiposo, además de ser mucho más accesible, hay un mayor porcentaje de MSC (un 2% del total de células del TA frente al 0,001-0,004% de la médula ósea) (Y.-H. Chang & Wu, 2015). En una operación de extracción de médula ósea con anestesia local se obtienen aproximadamente 40 ml, que equivalen a 2.4×10^4 células madre. En cambio, con la misma anestesia local en una liposucción se obtienen 200 ml de lipoaspirado, que corresponden a 2×10^8 células madre, por lo que el rendimiento es mucho mayor (Strem et al., 2005).

El tejido adiposo puede subclasificarse en tejido adiposo blanco (TA-B) y tejido adiposo marrón o pardo (TA-M), ambos con diferentes localizaciones, diferente composición y diferentes funciones (**Tabla 3; Figura 17A**). Mientras que el TA-B es la principal reserva energética del organismo, el TA-M es el principal sistema de disipación de energía. Ambos tejidos actúan por tanto de una forma coordinada,

consiguiendo así un equilibrio energético en el organismo (L. Badimon & Cubedo, 2017; L. Badimon et al., 2015; Corvera & Gealekman, 2014).

Tabla 3. Características de los tejidos adiposos blanco y marrón.

	Tejido adiposo blanco	Tejido adiposo marrón
Composición	<p><i>Adipocitos blancos</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - Una sola vacuola - Un núcleo lateral 	<p><i>Adipocitos pardos</i></p>  <ul style="list-style-type: none"> - Un núcleo central - Vacuolas lipídicas y mitocondriales
	<p><i>Estroma (SVF):</i> Formado por macrófagos, leucocitos, fibroblastos, células progenitoras y endoteliales</p>	
Función	<ul style="list-style-type: none"> - Almacenamiento de energía - Reservorio de MSC - Órgano endocrino 	<ul style="list-style-type: none"> - Regulación térmica

SVF; fracción vascular del estroma, del inglés, *Stromal Vascular Fraction*; MSC; células mesenquimales, del inglés, *Mesenchymal Stem Cells*.

4.1 El tejido adiposo pardo o marrón

El tejido adiposo marrón fue descubierto por primera vez en la glándula interescapular en los humanos o en la glándula de hibernación de los mamíferos. No fue hasta 1958 cuando, dada la presencia de este tejido también en animales que no hibernaban, se concluyó el papel termorregulador del tejido adiposo marrón. Se estudió entonces la localización del TA-M en los humanos, viendo que estaba ampliamente distribuido en los bebés, cubriendo sobre todo la zona del cuello y los hombros y que este iba desapareciendo a lo largo de los años. Finalmente, en los individuos adultos el TA-M remanente se distribuye por la zona del cuello, supraclavicular, paraaórtica y pericárdica y la glándula suprarrenal (Lidell, Betz, & Enerbäck, 2014; Schulz & Tseng, 2013).

4.2 El tejido adiposo blanco

El tejido adiposo blanco constituye la principal reserva energética del organismo, aunque también actúa como elemento protector de algunos órganos. Ante un alto gasto o un bajo aporte energético, el TA-B es capaz de movilizar los depósitos de lípidos, logrando una liberación de ácidos grasos y glicerol que son transportados a los diferentes tejidos a través de la sangre. En cambio, cuando se produce un aporte energético alto, el exceso se acumula en el TA-B en forma de TG. El TA-B es capaz de liberar un gran número de factores, participando así en numerosos procesos biológicos. Además, el tejido adiposo blanco ha cobrado gran importancia en los últimos años ya que actúa como un gran reservorio de MSC (Esteve Ràfols, 2014).

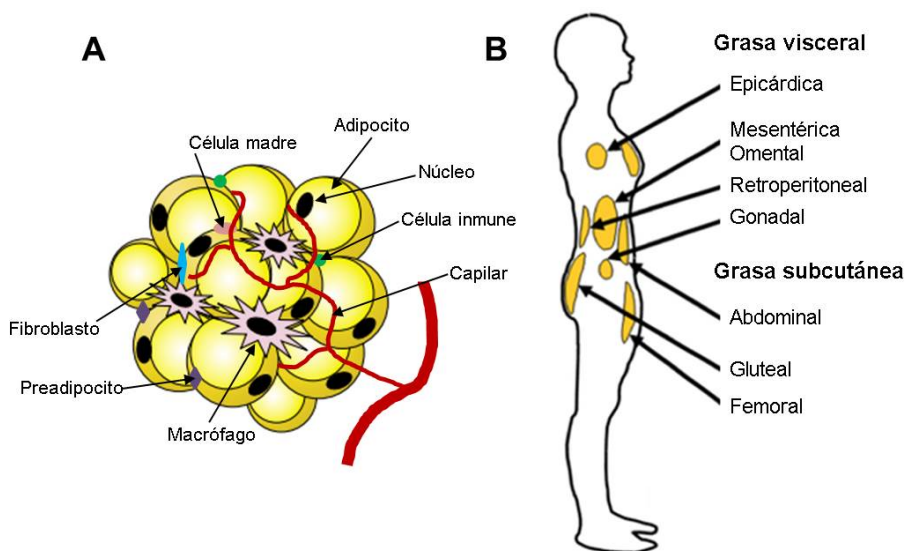


Figura 17. Tejido adiposo blanco. (A) Composición del tejido adiposo blanco. (B) Localización y distribución de los diferentes depósitos de tejido adiposo blanco. Adaptada de (Wronska & Kmiec, 2012)

Además, se sabe que el TA-B está íntimamente relacionado con los procesos de angiogénesis e inflamación. Durante el desarrollo embrionario, la adipogénesis y la angiogénesis actúan de forma

simultánea, por lo que no es raro pensar que el tejido adiposo también tenga importancia en el proceso de angiogénesis en la edad adulta. Como hemos visto, la obesidad es un factor de riesgo importante en el desarrollo de la enfermedad cardiovascular y el tejido adiposo de un individuo obeso es también diferente del tejido adiposo de un individuo de peso normal. Mientras que el tejido adiposo normal está compuesto por adipocitos y células inmunes con potencial anti-inflamatorio (Macrófagos M2, Células T CD4 positivas y eosinófilos), a medida que el individuo aumenta su peso los adipocitos se vuelven cada vez más hipertróficos, hipóxicos y disfuncionales liberando moléculas pro-inflamatorias que a su vez atraen células pro-inflamatorias como neutrófilos, células T CD8 positivas, células B, mastocitos e interferón- γ -Th1 (**Figura 18**).

Sin embargo, no todos los TA-B son iguales, sino que poseen diferentes características dependientes de su localización (**Figura 17B**). Además, como hemos visto anteriormente, la obesidad no siempre está asociada a un efecto perjudicial, sino que el tejido adiposo puede también tener un efecto protector, dependiendo principalmente de su localización y composición (Schetz et al., 2019). Así, como respuesta a una ingesta excesiva, el tejido adiposo se vuelve hipóxico y disfuncional y aumenta de tamaño. Este aumento puede ocurrir de dos maneras; aumento del número de adipocitos (hiperplasia), característico principalmente del tejido adiposo subcutáneo, o aumento del tamaño de los adipocitos (hipertrofia), que se da tanto en el tejido adiposo subcutáneo como en el visceral (Choe, Huh, Hwang, Kim, & Kim, 2016). La hiperplasia del tejido adiposo suele estar considerada como un mecanismo “sano” de expansión del tejido adiposo, ya que produce una activación de las células madre progenitoras. En cambio, la hipertrofia de los adipocitos suele estar relacionado con procesos de inflamación y estrés oxidativo, pudiendo

incluso llevar a la destrucción de los adipocitos (Oikonomou & Antoniades, 2019).

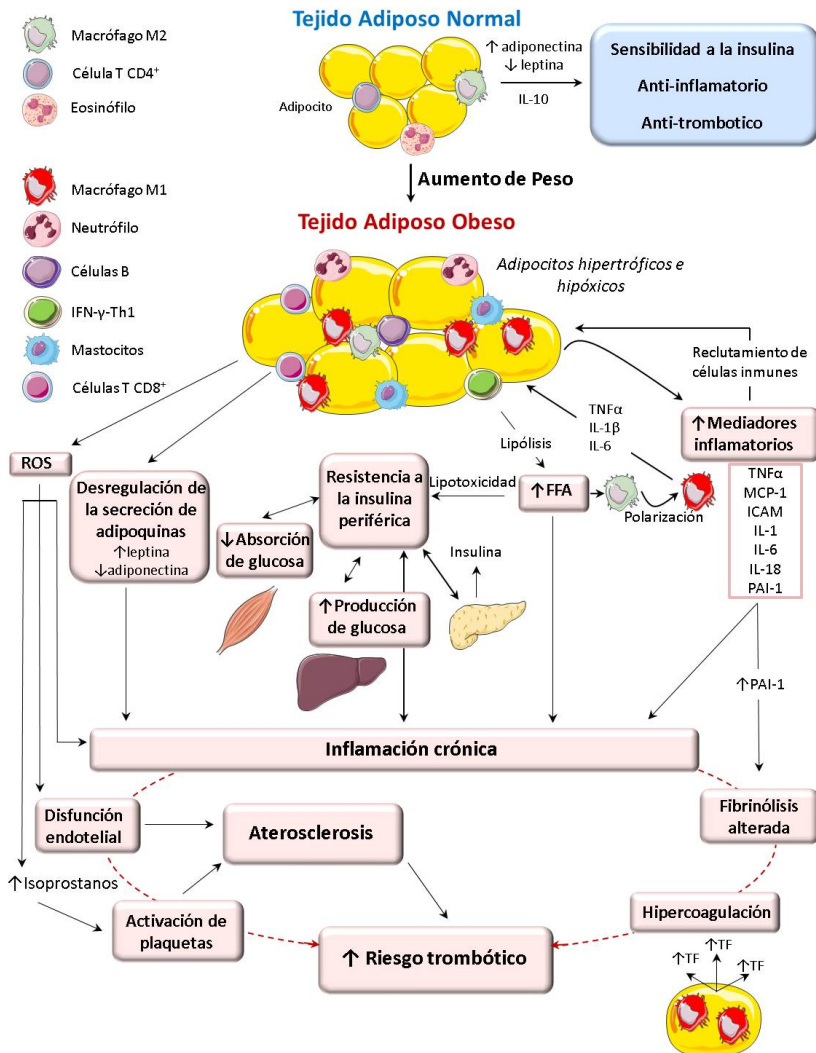


Figura 18. Consecuencias fisiológicas de la obesidad en el tejido adiposo. Adaptada de (Rocca et al., 2018).

4.2.1 Tejido adiposo Subcutáneo

La distribución del tejido adiposo subcutáneo (TA-S) depende del sexo y la edad. En los hombres, la acumulación de TA-S se da principalmente en el abdomen, en cambio en las mujeres la distribución del TA-S es equiparable en caderas y abdomen. A medida

que transcurren los años esta distribución varía, llegando equilibrarse el porcentaje de grasa en la zona abdominal y las caderas de los hombres mayores de 50 años, y aumentando el porcentaje de grasa abdominal de las mujeres (Marcadenti & de Abreu-Silva, 2015). La acumulación de grasa en el compartimento subcutáneo se asocia a un efecto metabólico neutro o incluso beneficioso (McLaughlin, Lamendola, Liu, & Abbasi, 2011), sin embargo, dentro del propio TA-S existen diferencias dependiendo de la localización, sobre todo en personas con sobrepeso u obesidad encontrando que los niveles de expresión de determinados genes se encuentra afectada (Rehrer et al., 2012).

4.2.2 Tejido adiposo Visceral

El tejido adiposo visceral (TA-V) se encuentra acumulado en la zona omental y mesentérica, está asociado con la obesidad central y se relaciona con el desarrollo de complicaciones metabólicas.

La relación entre la obesidad y la ECV ha sido ampliamente estudiada, sin embargo, el riesgo de sufrir un evento cardiovascular está íntimamente relacionado con la localización del exceso del tejido adiposo, siendo el tejido visceral el que posee una mayor implicación en la enfermedad cardiovascular comparado con la adiposidad subcutánea.

Se sabe también que el TA-V que recubre cada órgano concreto posee unas características anatómicas y funcionales diferentes, además, debido a su proximidad el órgano puede desempeñar un efecto sistémico (Calabuig et al., 2017).

- Tejido Adiposo Epicárdico (TA-E):

El corazón está formado por diferentes capas de músculo y tejido. La capa más interna, en contacto con la sangre y el interior de las

diferentes cavidades es el endocardio. Sobre este se encuentra el tejido musculoso del corazón, el miocardio y en la parte más externa se encuentra el pericardio, que es una membrana fibroserosa de dos capas que envuelve el corazón, aislándolo y protegiéndolo del resto de órganos y estructuras del exterior. El pericardio está formado por el pericardio seroso (el más interno, también conocido como epicardio) y pericardio fibroso, la zona más externa y resistente (**Figura 19**) (Netter, 2006).

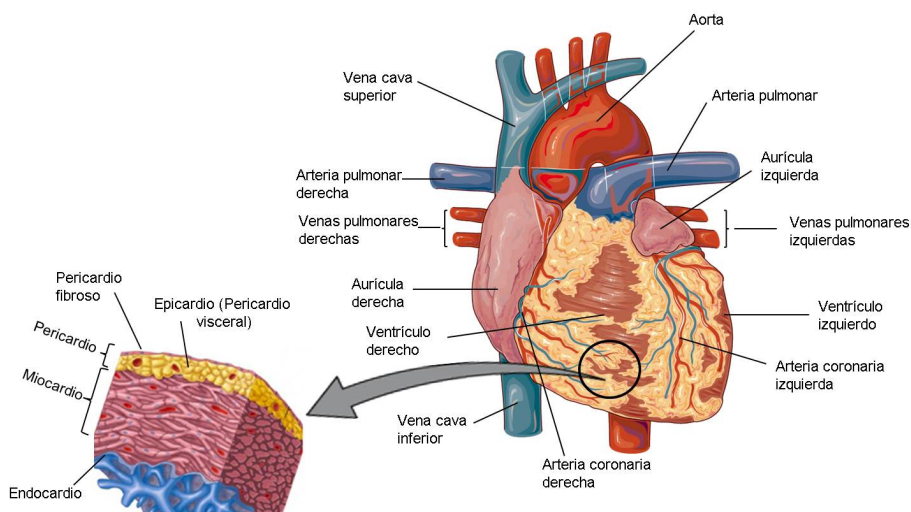


Figura 19. Anatomía interna y externa del corazón.

Existen diferentes depósitos de grasa sobre el corazón, con diferentes propiedades y composición, aunque la distinción y nomenclatura de estos tejidos adiposos aun no está clara y existe controversia al respecto. Los términos epicárdico y pericárdico han sido utilizados en la literatura indistintamente en muchos casos, y es ahora cuando se ha empezado a establecer la clara distinción entre ellos (Bertaso, Bertol, Duncan, & Foppa, 2013; Fitzgibbons & Czech, 2014; Selthofer-Relatić & Bošnjak, 2015).

Iacobellis, G definía la grasa epicárdica como aquella que se encuentra entre la pared externa del miocardio y la capa visceral del

pericardio, y la grasa pericárdica la que se localiza entre el pericardio visceral y parietal (Iacobellis, 2009). Por su parte, Chhabra y Gurukripa Kowgli definieron el TA-E como el que se localiza principalmente en los surcos atrioventricular e interventricular, y junto a las arterias coronarias, y en menor medida en la pared libre del ventrículo derecho y el ápex, donde predomina el tejido adiposo pericárdico (TA-P). Además, la vascularización del TA-E proviene de la circulación coronaria, mientras que el suministro sanguíneo del TA-P proviene de fuentes no coronarias (Chhabra & Gurukripa Kowgli, 2015). Sin embargo, en línea con la definición de Iacobellis, en esta tesis definimos el tejido adiposo epicárdico perivascular (TA-PV) como aquel que recorre las arterias coronarias, mientras que el tejido adiposo acumulado en la zona del ápex (evitando las zonas irrigadas por los grandes vasos) lo definimos como tejido adiposo ventricular del miocardio (TA-VM).

El 80% del corazón está cubierto por TA, correspondiendo a un 20% del peso total del órgano en condiciones normales, aunque este porcentaje aumenta significativamente con la obesidad así como con la edad (Guglielmi & Sbraccia, 2017). Como otros tejidos adiposos blancos, los tejidos adiposos cardiacos actúan como depósito de lípidos, secretando hormonas como órgano endocrino, y como secretor de citoquinas y quemoquinas inflamatorias. En este aspecto, y debido a su proximidad al miocardio, el TA-VM y el TA-PV juegan un papel muy importante en el desarrollo de enfermedad coronaria, en la inflamación crónica, la aterosclerosis y en el desarrollo de cardiomiopatías (Bertaso et al., 2013; Sacks & Fain, 2007).

4.2.3 Tipos de células existentes en el tejido adiposo blanco

Las células especializadas del tejido adiposo son los adipocitos, que constituyen entre el 60-70% del tejido adiposo adulto. Sus principales funciones son el metabolismo lipídico y la señalización paracrina,

autocrina y endocrina, mediante la secreción de adipoquinas, que les permiten modular la actividad metabólica del tejido adiposo pero también de órganos como el hígado, el cerebro y el músculo (**Figura 20**) (Esteve Ràfols, 2014; Kershaw & Flier, 2004).

Cambios en el balance metabólico entre los procesos de lipólisis y lipogénesis pueden producir un aumento de los ácidos grasos circulantes, que al venir acompañados de un aumento de peso puede llegar a desencadenar resistencia a la insulina. Esto es debido a que los ácidos grasos son, no solo moléculas energéticas, sino que también actúan como señales reguladoras de la expresión génica de proteínas implicadas en el metabolismo lipídico, pudiendo crear un estado protrombótico y asociándose a procesos de inflamación (Samad & Ruf, 2016). Por esto, el exceso de ácidos grasos circulantes (lipotoxicidad), asociado a un mayor consumo de calorías respecto a su gasto, es uno de los mayores vínculos entre la obesidad y el desarrollo del síndrome metabólico y la enfermedad cardiovascular (Bódís & Roden, 2018; Lafontan, 2014).

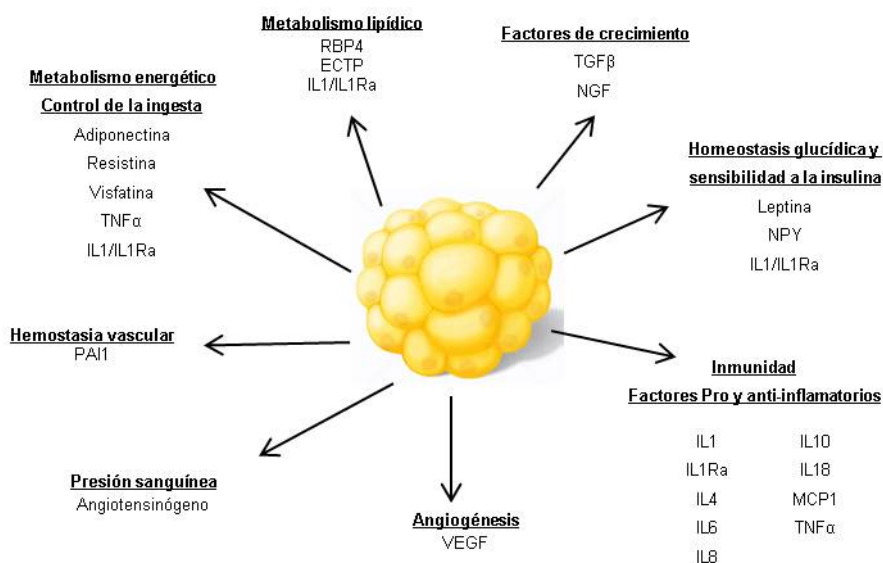


Figura 20. Procesos fisiológicos y metabólicos regulados por el TAB mediante la secreción de adipoquinas. Adaptada de (Esteve Ràfols, 2014)

El resto del tejido adiposo se denomina **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 (L. Badimon & Cubedo, 2017). Es por esta gran variedad celular que el tejido adiposo es capaz de producir y responder a un gran número de señales endocrinas, metabólicas e inmunológicas, así como estar implicado en otras muchas funciones (L. Badimon et al., 2015).

Los pericitos, las células endoteliales y las células musculares lisas, forman la vasculatura del tejido adiposo. 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 (Lemoine, Ledoux, & Larger, 2013). 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 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 (Bai & Sun, 2015).

Por último, en el SVF se encuentran las células madre derivadas del tejido adiposo (ASC, del inglés *Adipose-derived Stromal/Stem Cells*) y los preadipocitos. Las ASC ayudan a mantener la homeostasis del tejido y contribuyen a la renovación celular así como a la reparación del tejido dañado, pero también están implicadas en la expansión del tejido adiposo que se da en situaciones patológicas como la obesidad (L. Badimon & Cubedo, 2017). En respuesta a determinados

estímulos, estas células pueden diferenciarse a diferentes linajes. Las ASC presentan las siguientes características (L. Badimon et al., 2015):

- 1. Adherencia al plástico.** Las células deben adherirse al plástico mientras son mantenidas en condiciones estándar de cultivo.
- 2. Potencial de diferenciación:** Las ASC son capaces de diferenciarse a los linajes adipogénico, osteogénico, endotelial y condrogénico entre otros.
- 3. Marcadores de superficie:** Las ASC no presentan un único marcador de superficie característico, sino que expresan los marcadores característicos de las células madre mesenquimales. De esta forma, las ASC deben ser positivas para los marcadores de superficie CD29, CD44, CD105, CD73 y CD90 y negativas para los marcadores CD45, CD34 y CD14.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de mortalidad y morbilidad en el mundo. Los nuevos cambios socioculturales que se han dado lugar en los últimos años han llevado a que el estilo de vida en la población haya ido cambiando, aumentando el sedentarismo y las dietas hipercalóricas o poco equilibradas, así como incorporando nuevos hábitos perjudiciales como el mayor consumo de alcohol o el tabaquismo. Estos cambios han dado lugar al incremento de diversas alteraciones metabólicas como la obesidad, la diabetes, la hipertensión o la dislipidemia, que a su vez actúan como importantes factores de riesgo modificables de la enfermedad cardiovascular.

La búsqueda por tanto de nuevas estrategias que permitan reducir estos factores de riesgo y con ello reducir la incidencia de las enfermedades cardiovasculares es fundamental. Con este fin cobran gran importancia las intervenciones nutricionales, que permiten la prevención o reducción de las diversas alteraciones metabólicas mediante el cambio de hábitos alimenticios o la suplementación alimentaria con componentes naturales.

No obstante, se ha demostrado que además del importante papel que juegan los anteriormente citados factores de riesgo, el tejido adiposo blanco, tradicionalmente relacionado con la homeostasis energética, también juega un papel importante en el desarrollo de la enfermedad cardiovascular, estando estrechamente relacionado con los mecanismos de regulación del metabolismo glucídico, el remodelado vascular y de la formación de neovasos, así como con la coagulación sanguínea. Además, es un gran reservorio de células madre mesenquimales con gran importancia para la regeneración espontánea de tejidos lesionados y posiblemente para la terapia celular.

Por tanto, debido a la importancia de la diabetes, la hipercolesterolemia y la obesidad en la enfermedad cardiovascular, esta tesis doctoral busca profundizar en los posibles mecanismos de prevención y reducción de la enfermedad cardiovascular así como ampliar el conocimiento sobre el papel fundamental que el tejido adiposo tiene en el organismo. La **hipótesis** de este trabajo se basa en que el control nutricional mediante la suplementación con compuestos naturales de una dieta saludable tendrá efectos rápidos y directos sobre la reducción del riesgo cardiovascular, altamente influenciado por la composición y localización del tejido adiposo.

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

Objetivo 1. Investigar el efecto de la suplementación con productos naturales de la dieta para la prevención de la enfermedad cardiovascular.

- Investigar el efecto de la suplementación alimentaria con fitoesteroles en voluntarios obesos que no hayan padecido enfermedad cardiovascular clínica.
- Investigar el efecto de la suplementación alimentaria con omega-3 en voluntarios obesos que no hayan padecido una enfermedad cardiovascular clínica.
- Investigar el efecto producido por la sustitución en la dieta del azúcar común con un edulcorante natural sobre los niveles de glucosa en sangre, en individuos sanos, intolerantes a la glucosa o que padecen diabetes mellitus tipo 2.

Objetivo 2. Investigar la composición y funcionalidad de los diferentes depósitos de grasa del cuerpo humano.

- Investigar el perfil transcriptómico del tejido adiposo en función de su localización y la presencia de factores de riesgo.
- Estudio del papel angiogénico de las células madre derivadas de tejido adiposo de diferentes depósitos de grasa.
- Estudio de las microvesículas secretadas por las células madre derivadas de tejido adiposo de diferentes localizaciones.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. DISEÑO EXPERIMENTAL

Para alcanzar los objetivos propuestos en esta tesis se siguió el siguiente esquema experimental

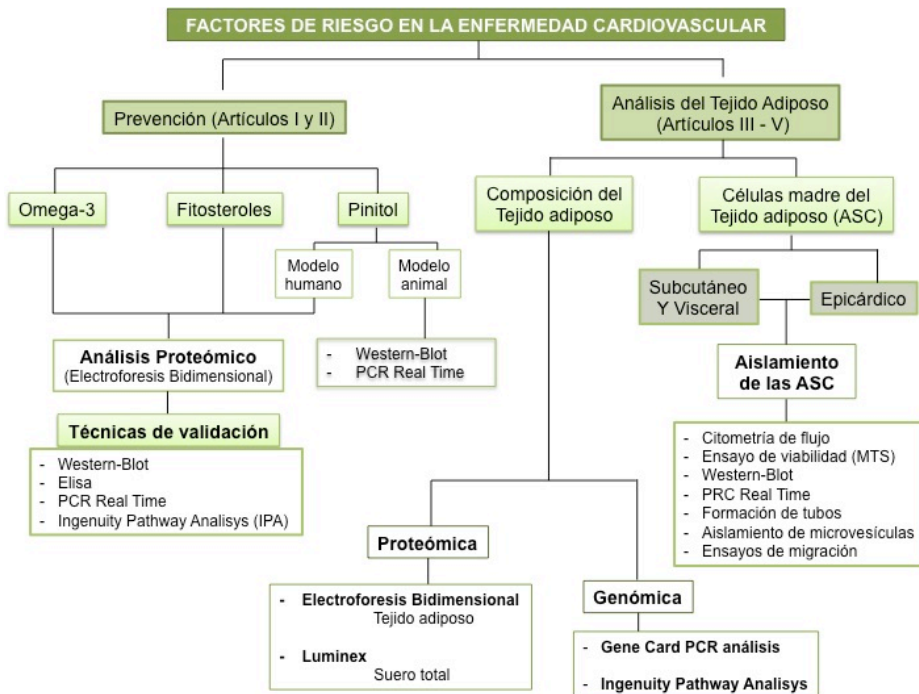


Figura 21. Diseño experimental.

2. POBLACIONES DE ESTUDIO

En esta tesis se han estudiado diferentes poblaciones de voluntarios y pacientes:

2.1 Estudio del efecto de la leche suplementada con omega-3 o fitoesteroles

Se realizó el estudio en un total de 32 individuos de entre 25 y 70 años que presentaban sobrepeso u obesidad de grado 1 (IMC = 25-35 Kg/m²). Los criterios de exclusión fueron los siguientes:

- Enfermedad crónica incluido cáncer, hiperlipidemia, diabetes mellitus tipo 2 (DM2), hipertensión o algún tipo de enfermedad cardiovascular, hepática o renal.
- Uso de fármacos para la reducción de lípidos, como los β -bloqueantes.
- Uso de diuréticos.
- Intolerancia a la lactosa.
- Estar realizando algún programa de pérdida de peso.

Este estudio es un estudio de doble ciego, aleatorio con dos brazos de tratamiento. En primer lugar los voluntarios fueron sometidos a un periodo de adaptación de dos semanas en el que se les pedía hacer vida y dieta normal. Posteriormente, los voluntarios se dividen en dos grupos (N=16), al primer grupo se le administra leche suplementada con Omega-3 y al segundo grupo, leche suplementada con fitoesteroles. Los voluntarios debían ingerir 250 ml de leche diaria durante 28 días. Posteriormente fueron sometidos a un periodo de lavado en el que ingirieron la misma cantidad de leche sin suplementar, de modo que los niveles lipídicos volvieron al estado basal e iniciaron un nuevo periodo de 28 días en el que debían ingerir

la leche suplementada que no habían ingerido durante el primer periodo, leche con fitoesteroles el primer grupo, y leche con omega-3 el segundo grupo. Los voluntarios fueron sometidos a un seguimiento telefónico durante todo el estudio. Además, al inicio y final de cada periodo del estudio se tomaron muestras de sangre de todos los voluntarios (Figura 22).

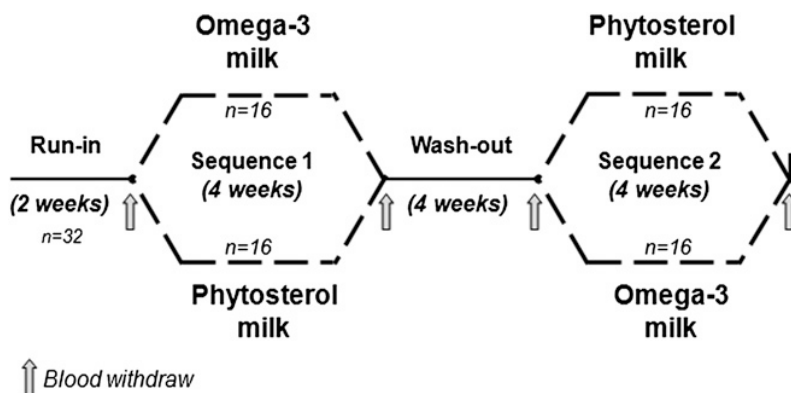


Figura 22. Esquema de las intervenciones del estudio.

2.2 Estudio del efecto del edulcorante Fruit-Up®

Fueron incluidos en este estudio un total de 118 voluntarios de entre 18 y 32 años y cuyo IMC estaba comprendido entre 19-40 Kg/m². Todos los pacientes presentaban un perfil proteico y hematológico normal, y además con una función hepática, renal y coronaria también normal. Los voluntarios fueron agrupados en tres grupos con diferentes criterios de exclusión:

- Voluntarios sanos (N=40)
- Intolerantes a la glucosa (N=40): glicemia en ayunas entre 100 and 125 mg/dl en al menos dos ocasiones y/o un rango de HbA1 del 5,7–6,4%.
- Diabetes mellitus tipo 2 (N=38): Los criterios de inclusión se establecieron de acuerdo a la “American Diabetes Association

MATERIALES Y MÉTODOS

guidelines (American Diabetes Association, 2012)”: glicemia en ayunas ≥ 126 mg/dl en al menos dos ocasiones, o glicemia 2 h después de comer de 75 g, carga oral de glucosa ≥ 200 mg/dl, o HbA1c $\geq 6,5\%$. Los criterios de exclusión fueron la diabetes mellitus tipo 1, neoplasma maligno, triacilgliceroles (TG) >400 mg/dl, complicaciones macro-vasculares, pacientes con una diabetes mellitus tipo 2 poco controlada (HbA1c $\geq 8\%$) o que hayan sido tratados con insulina o inhibidores intestinales de la disacaridasa.

Este estudio es un estudio de doble ciego, aleatorio con dos brazos de tratamiento. En primer lugar los voluntarios fueron sometidos a un periodo de adaptación de dos semanas en el que se les pedía hacer vida y dieta normal. Posteriormente, cada grupo de voluntarios se subdivide en dos grupos (N=20 para voluntarios sanos e intolerantes a la glucosa y N=18 para voluntarios con DM2), al primer grupo se le asigna una bebida enriquecida con sacarosa que funcionará como placebo y al segundo grupo se le administra una bebida enriquecida en pinitol. Los voluntarios debían ingerir dos tomas de 250 ml la bebida edulcorada asignada (enriquecida en sacarosa o pinitol) durante 6 semanas. La composición en macronutrientes y carbohidratos de la bebida enriquecida en sacarosa era muy similar a la bebida enriquecida en pinitol pero excluyendo los inositoles.

Para la validación de este estudio se incluyó un estudio animal para el cual se utilizaron 10 ratas Male Zucker diabetic fatty (ZDF; 350 g \pm 30 g; 12 semanas). Se trata de un modelo animal de diabetes mellitus tipo 2. Estas ratas fueron alimentadas con una dieta en carbohidratos, proteína y grasa para que desarrollaran dicha enfermedad. Se subdividieron en dos grupos (N=5) y a cada uno de ellos se le administró aleatoriamente una solución de sacarosa o pinitol durante 4

semanas. La cantidad de inositoles administrada era equivalente a la dosis de los humanos (4 g de pinitol/día).

2.3 Estudio del efecto de la diabetes en el tejido adiposo de pacientes obesos.

En este estudio se analizó el tejido adiposo de pacientes con diferentes factores de riesgo (N=38).

- Pacientes no obesos y no diabéticos (N=11)
- Pacientes obesos tipo 3 y no diabéticos (N=13)
- Pacientes obesos tipo 3 y diabéticos (N=14)

Las grasas subcutánea y visceral de pacientes obesos fueron obtenidas simultáneamente durante el procedimiento de cirugía bariátrica de bypass gástrico en Y de Roux por laparoscopia. Además, previo a la cirugía, a los pacientes se les exigía una pérdida de entre el 5 y el 8 % de su masa corporal. Por otro lado, los pacientes no obesos fueron sometidos a diferentes intervenciones quirúrgicas: lipectomía abdominal, colecistectomía, hernia de hiato o apendectomía. Además, se obtuvieron muestras de suero y plasma en el momento de la operación. En todos casos los pacientes seguían la medicación correspondiente indicada por las guías. El protocolo de este estudio fue aprobado por el comité Ético del Centro Médico Teknon de Barcelona de acuerdo con la Declaración de Helsinki.

2.4 Estudio de la importancia de la localización del tejido adiposo cardiaco.

En este estudio se analizaron diferentes depósitos de grasa alrededor del corazón en pacientes con insuficiencia cardiaca (N=30).

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras de grasa de diferentes localizaciones, así como secciones de las diferentes arterias coronarias fueron obtenidas durante cirugías de trasplante de cardiaco en el Hospital de la santa creu y sant Pau. Los pacientes padecían distintas patologías cardiovasculares y estaban tratados con las medicaciones correspondientes según las guías clínicas:

- Cardiomiopatía isquémica (40%)
- Cardiomiopatía no-isquémica (34%)
- Cardiomiopatía congénita (13%)
- Cardiomiopatía familiar (10%)
- Otras ECV (3%)

El consentimiento informado de los pacientes fue exigido en todos los casos. El protocolo de este estudio fue aprobado por el comité Ético del hospital de acuerdo con la Declaración de Helsinki.



3. MODELO ANIMAL

En 1962, Lois M. Zucker y Theodore F. Zucker en un cruce entre ratas Merck M y ratas Sherman descubrieron las ratas Zucker obesas.

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 (Zucker, 1965).

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 las 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. Además, presentan hiperlipidemia e hipertensión, y desarrollan resistencia a insulina. Se detectó en un subgrupo de estas ratas Zucker una mutación espontánea que hacía a las ratas incapaces de compensar la resistencia a la insulina convirtiéndolas por tanto en ratas Zucker diabéticas (ZDF, del inglés, Zucker Diabetic Fatty) (Tofovic & Jackson, 2003). En este estudio se utilizaron ratas ZDF, alimentadas con una dieta rica en proteína, carbohidratos y grasa (LabDiet® 5008 Formulab, P.O. Box 19798 St. Louis, MO, USA) y agua ad libitum. 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”* (National Research Council (US) Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals., n.d.). Los animales se mantuvieron estabulados

MATERIALES Y MÉTODOS

en un ambiente controlado a 20.0-22.0°C, 60 % de humedad relativa y ciclos de día/noche de 12 horas.

A las 16 semanas, tras 4 semanas de experimento, los animales fueron anestesiados con una combinación de ketamina, medetomidina y brupenorfin a una dosis de 75 mg/kg, 0.5 mg/kg y 0.1 mg/Kg respectivamente mediante inyección intraperitoneal y sacrificados mediante sobredosis con pentobarbital (400 mg/kg) por punción cardíaca. Una porción de diferentes órganos fue entonces extraído y congelado de forma inmediata a -80°C hasta su posterior uso.

Se obtuvieron muestras de sangre de la vena lateral de la cola que fueron utilizadas para los análisis proteómicos así como para la determinación de los niveles de glucosa circulantes. Para ello los animales se mantuvieron en ayunas durante 4 horas y se analizó una muestra de sangre con un medidor Glucocard™ Memory 2 (Menarini Diagnostics, Florencia, Italia). La sangre obtenida para análisis proteómicos se introdujo en tubos de separación de suero (TAPVAL®, Montlab) se incubó a 37°C para promover la formación del coágulo. Posteriormente se centrifugó a 1.800 xg a 4°C durante 15min. El suero aislado se repartió en alícuotas y se almacenó a -80°C hasta su análisis.

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

4. ANÁLISIS PROTEÓMICO

La principal estrategia para llevar a cabo los estudios proteómicos consiste en separar las proteínas de una muestra (célula, tejido o fluido) por electroforesis bidimensional (2-DE; **Figura 23**), en la que las proteínas se separan primero por su punto isoeléctrico y luego por su peso molecular, obteniendo un mapa de puntos proteicos en el que cada punto corresponde a una proteína o a una variante de una proteína. Posteriormente se realiza un análisis comparativo del perfil proteómico entre los diferentes grupos a estudiar. Una vez realizado este análisis, se hace una selección de los puntos con un perfil diferencial y se identifican mediante espectrometría de masas (MS) (Vivanco, López-Bescós, Tuñón, & Egido, 2003).

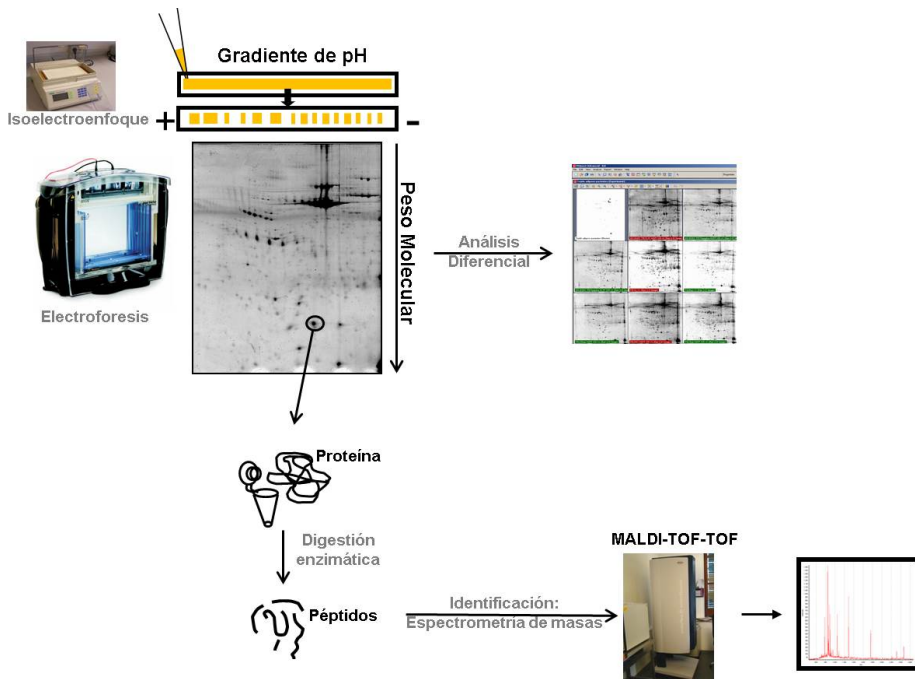


Figura 23. Esquema del análisis proteómico. Secuencia detallada de la electroforesis bidimensional, el análisis proteómico diferencial y la identificación proteica por espectrometría de masas.

4.1. Obtención de las muestras

Para el análisis proteómico se han utilizado muestras de suero y plasma humano así como de tejido adiposo.

Para el análisis de suero y plasma se extrajeron muestras de sangre a los voluntarios tras 12 horas de ayunas en tubos Vacutainer® sin anticoagulante o tubos Vacutainer® con EDTA para el aislamiento del suero y del plasma respectivamente.

Los tubos de suero fueron incubados a 37°C durante media hora para que la muestra se coagule, posteriormente se volvieron a incubar a 4°C otra media hora para que el coágulo se retraiga y finalmente se centrifugaron a 3000 rpm, 4°C, 35 minutos más, para separar el suero. En el caso de las muestras de plasma, los tubos de EDTA fueron directamente centrifugados a 2500 rpm y 4°C durante 20 minutos, de forma que se separa el plasma sanguíneo del hematocrito, las plaquetas y las células blancas. Una vez aislados el suero y el plasma, fueron alicuotados y congelados a -80°C hasta su utilización.

Para el análisis proteómico de muestras de tejido adiposo el tejido fue recogido en quirófano en un ambiente estéril, lavado con PBS (del inglés, Phosphate buffered saline) e inmediatamente congelado en N₂ líquido y almacenado a -80°C hasta su utilización.

4.2 Preparación De La Muestra

Se han utilizado diferentes protocolos de preparación de muestra en función del tipo de muestra a analizar.

4.2.1. Subfraccionamiento del suero y plasma humano para la extracción de proteínas mayoritarias

Para el análisis de suero y plasma humano se requiere previamente la eliminación de las proteínas mayoritarias que pueden interferir en el análisis. Primero las muestras de suero y plasma fueron sonicadas (6 ciclos de 15 seg. de sonicado, seguido de 30 seg. de descanso en hielo) y se filtraron (0,22 μm) mediante centrifugación para eliminar impurezas.

Para la eliminación de proteínas mayoritarias se utilizaron 2 métodos diferentes.

A. Método para eliminar albúmina e inmunoglobulinas (IgGs) (Albumina e IgG removal kit, GE Healthcare): Se hace pasar la muestra por una resina que elimina de forma selectiva estas dos proteínas del suero humano. La albúmina e IgGs son retenidas en la resina y descartadas, mientras que las proteínas minoritarias se eluyen por centrifugación.

B. Método para eliminar las 6 o 14 proteínas mayoritarias, albúmina, transferrina, IgGs, IgAs, haptoglobina y α 1-antritipsina en el caso de las 6 mayoritarias y albúmina, transferrina, IgGs, IgAs, haptoglobina, α 1-antritipsina, antitripsina, fibrinógeno, α 2-macroglobulina, α 1-acido glicoproteína, IgM, apolipoproteína AI, apolipoproteína AII, complemento C3 y transtiretina en el caso de las 14 mayoritarias (Multiple Affinity Removal Spin Cartridge, Agilent Technologies): Este método consiste en un cartucho con una resina formada por diferentes anticuerpos que se unen a dichas proteínas mayoritarias, de modo que el resto de proteínas se eluyen por centrifugación. Una vez eluidas todas las proteínas minoritarias, las proteínas mayoritarias se eluyen

también con otro tampón de modo que pueden ser recuperadas o descartadas según las necesidades del experimento.

4.2.2. Concentración de proteínas del suero

Las muestras se concentraron y se eliminaron las sales mediante centrifugación con filtros de 5 kDa de corte. Durante esta fase el tampón de la muestra se cambió a un tampón urea (urea 8 M y 2% Chaps), óptimo para solubilizar las proteínas del suero para la 2-DE.

4.2.3. Extracción de proteínas de HDL humanas

Las HDL se obtuvieron mediante ultracentrifugación en gradiente de KBr a partir de la fracción total del suero (Havel, Eder, & Bragdon, 1955). La concentración de proteína de la fracción de HDL se cuantificó por el método del BCA y posteriormente las HDL se deslipidaron mediante la precipitación de proteína con 7 volúmenes de acetona pura fría durante 2 horas a -20°C. Posteriormente las proteínas se solubilizaron con un tampón urea/tiourea (urea 7 M, tiourea 2 M y 2% de CHAPS) en caso de que fuesen preparadas para 2-DE o en un tampón de Tris 125 nM si fueron preparadas para Western-Blot.

4.2.4. Extracción de proteínas de las LDL humanas

Las LDL humanas se aislaron también mediante técnicas de ultracentrifugación en gradiente de KBr a partir de la fracción total de suero y se deslipidaron siguiendo el protocolo descrito por Karlsson et al. (Karlsson, Leanderson, Tagesson, & Lindahl, 2005) con algunas modificaciones. Se partió de 1 mg de LDL (1 g/l apoB) y se deslipidó incubando 90 min a -20°C con 14 ml de una mezcla de tributil fosfato:acetona:metanol (1:12:1), seguido de una ultracentrifugación a 2800 xg durante 15 min. Posteriormente, la proteína precipitada se

lavó de forma secuencial con 1 ml de tributil fosfato, acetona y metanol, y se dejó secar al aire. Los precipitados se hirvieron 3 min en una solución de DTT 0.325 M, 4% de CHAPS y tris 0.045 M; se dejaron enfriar a temperatura ambiente, se diluyeron (1:15) en la solución urea/tiourea (urea 7 M, tiourea 2 M y 2% de CHAPS) y finalmente se incubaron 15 min a 35°C.

4.2.5 Extracción de la fracción soluble proteica del plasma.

Para obtener la fracción soluble proteica del plasma (LPDP, del inglés, *Lipid depleted plasma*), las muestras fueron centrifugadas a 25000 xg durante 45 minutos a temperatura ambiente para así eliminar las microvesículas. Las muestras fueron entonces sonicadas y filtradas en un filtro de 22 µm para eliminar impurezas y las 14 proteínas mayoritarias eliminadas utilizando una columna específica de afinidad (Multiple Affinity Removal Spin Cartridge, Agilen Technologies) y la muestra disuelta en un tampón de urea (urea 8M y 2% de CHAPS) en caso de que fuesen preparadas para 2-DE o en un tampón de Tris 125 nM si fueron preparadas para Western-Blot.

4.2.6 Extracción de proteínas del tejido adiposo

Para la extracción proteica de la muestra, el tejido adiposo fue triturado en un mortero y diluido en un buffer de lisis (8.4 M Urea, 2.4 M tiourea, CHAPS 50g/L y 50mM DTT). Las muestras fueron sonicadas en hielo (6 ciclos de 15 segundos) y la mezcla agitada en una noria durante 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente la dilución se centrifugó a 60000 rpm durante 90 minutos y la fase acuosa se recogió en un nuevo tubo y se almacenó a -80°C hasta su utilización.

4.2.7 Cuantificación de proteínas

En todos los casos, la concentración de proteína de las muestras preparadas para 2-DE se cuantificaron utilizando un método comercial, el 2D Quant Kit (GE Healthcare). Este es un método específico para muestras que contienen urea y funciona mediante la precipitación de las proteínas dejando las sustancias que pueden interferir en solución. Dichas proteínas precipitadas se cuantifican por su unión específica al cobre, de tal forma que el cobre no unido es el que reacciona por lo que la lectura de densidad está inversamente relacionada con la concentración de proteína. El umbral de sensibilidad de este ensayo es de 0,5µg.

En el caso de cuantificación de proteína para western-blot, técnica para la que la muestra no debe estar disuelta en un tampón de urea, se utilizó el Pierce BCA Protein Assay Kit (ThermoScientific), basado en una reacción de quelación en la que el Cu^{2+} es reducido a Cu^{1+} por proteínas en un medio alcalino. La adición de BCA produce producto final de color morado que es detectado por colorimetría 562nm en un lector de placas (Spectra Max 190, Molecular Device).

4.3 Electroforesis Bidimensional

Dependiendo del el fin para el que se realice la electroforesis se parte de una cantidad de proteína diferente. Para comparar el perfil proteómico de diferentes muestras se utilizaron geles analíticos, en los que se cargaron entre 100 y 150 µg de proteína, en cambio, cuando los geles son utilizados para la identificación de proteínas por espectrometría de masas, se utilizaron geles preparativos, en los que se cargaron un mínimo de 300 µg.

4.3.1 Primera dimensión

En la primera dimensión, las proteínas se separan por su punto isoeléctrico en un isoelectroenfoque (IEF) en tiras de acrilamida con un gradiente de pH inmovilizado. El rango de pH de la tira depende del tipo de muestra analizada (**Tabla 4**).

Tabla 4. Condiciones de la 2-DE para los diferentes tipos de muestra.

Muestra	Tampón	Hidratación	1ª Dimensión	2ª Dimensión
Plasma humano	8M urea; 2% chaps; 1,6% anfolitos; 0,02% azul de bromofenol	Pasiva	4 - 7	10%
LPDP	7M urea; 2M tiourea; 2% chaps; 1,6%DTT; 0,2% anfolitos; 0,02% azul de bromofenol	Pasiva	4 – 7	10%
HDL humanas	7M urea; 2M tiourea; 2% chaps; 1,6%DTT; 0,2% anfolitos; 0,02% azul de bromofenol	Pasiva	4 – 7	12%
LDL humanas	7M urea; 2M tiourea; 2% chaps; 1,6%DTT; 0,2% anfolitos; 0,02% azul de bromofenol	Pasiva	4 - 7	10%
Tejido adiposo humano	7M urea; 2M tiourea; 2% chaps; 1,6%DTT; 0,2% anfolitos; 0,02% azul de bromofenol	Activa	4-7	12%

2-DE, electroforesis bidimensional; LPLP, fracción soluble proteica del plasma; HDL, lipoproteínas de alta densidad; LDL, lipoproteínas de baja densidad; DTT, Ditiotreitól.

Es necesario que las tiras sean hidratadas antes de ser utilizadas para la separación de las proteínas según su pH. Existen diferentes tipos de hidratación en función de la muestra que se quiera analizar, en esta tesis se utilizaron la hidratación activa y la hidratación pasiva:

- Hidratación activa: se aplica una corriente de 50V durante 12 horas de forma constante para facilitar que las proteínas entren en el gel de la tira.
- Hidratación pasiva: no se aplica ningún tipo de corriente a la tira, sino que las proteínas se van difundiendo pasivamente hacia el gel de la tira durante 12 horas a temperatura ambiente.

Una vez hidratadas las tiras, se aplican diferentes aportes energéticos para que las proteínas se separen a lo largo de la tira según su pH (**Tabla 5**).

Tabla 5. Programa de voltajes del IEF.

Hidratación	Paso 1	Paso 2	Paso 3	Mantenimiento
Activa/Pasiva	250V; 15min lento	10000V; 3h lento	Hasta 55000V; lineal	500V; 24h rápido

4.3.2 Segunda dimensión

En la segunda dimensión las proteínas son separadas en función de su peso molecular en geles de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE). Se utilizaron diferentes porcentajes de acrilamida en función del tipo de muestra (**Tabla 4**). Tras el IEF, antes de realizar la segunda dimensión, las tiras se equilibraron primero en una solución reductora (Tris-HCL 50 mM, pH 8,8, urea 6M, SDS 2%, glicerol 30 % y 2% DTT) y después en una solución alquilante (50 mM Tris-HCL pH 8,8; urea 6 M, SDS 2%, glicerol 30% y 2% iodoacetamida), cada paso durante 15 minutos, a fin de proteger las proteínas frente a procesos oxidativos y evitar la aparición de rayas verticales en los geles (*streaking*).

Para la visualización de las proteínas, los geles se tiñeron con una tinción fluorescente (Flamingo fluorescent stain; BioRad). Al final del proceso, los geles se escanearon con un equipo Typhoon 9500 (GE

Healthcare) que permite ver fluorescencia, y así visualizar las proteínas y obtener el patrón proteómico de cada muestra analizada.

4.4 Análisis Diferencial

En todos los casos, los diferentes grupos analizados se procesaron en paralelo para así garantizar una mínima variabilidad entre grupos. Los patrones proteómicos de las diferentes muestras se compararon mediante el programa de análisis PDQuest (versión 8.0; Bio Rad), que utiliza un gel patrón en el que se incluyen todos los geles analizados. El programa asigna a cada punto proteico un valor relativo, en función de la suma total de todos los puntos proteicos del gel, tras la sustracción de la señal de fondo. Posteriormente se hace la comparación manual de todos los geles, de forma que se especifiquen los puntos proteicos equivalentes en los diferentes geles analizados (*Matching*).

4.5 Identificación De Las Proteínas.

Tras el análisis diferencial, las proteínas fueron identificadas mediante espectrometría de masas (MS). Este proceso se realiza en los siguientes pasos:

- Los puntos proteicos del gel se recortan y aíslan automáticamente con un Ettan Spot Picker (GE Healthcare).
- Los trozos de gel son lavados con una solución de Ambic 25 mM.
- Se deshidratan los trozos de gel primero con una solución Ambic 25 mM/ACN 50% y después con ACN (Acetonitrilo) 100%.
- Se secan las muestras haciendo vacío (Speed Vac).

- Las proteínas se digieren enzimáticamente con un volumen de gel de tripsina porcina modificada (Promega), que corta el extremo C-terminal de todos los residuos de lisina y arginina de las proteínas.
- Se limpian los restos de sales de los péptidos obtenidos mediante digestión enzimática y se concentran utilizando filtros ZipTuiU-C18 (Merck-millipore).
- Estos péptidos se mezclan con una matriz (-ciano-4-hidroxycinámico 5 mg/mL) y se depositan en placas *Prespotted AnchorChip plates* (Bruker Daltonics) y se deja secar para que se cristalice.
- La placa se introdujo en el equipo para su análisis.

Para la identificación de las proteínas, se utilizó un espectrómetro de masas tipo MALDI-TOF (*matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight*; AutoFlex III Smartbeam MALDI-TOF/TOF de Bruker Daltonics), formado por una fuente de ionización del tipo desorción/ionización mediante laser asistida por matriz (MALDI) y un analizador de masas “tiempo de vuelo” (TOF), en el que la separación de iones se basa en el tiempo que tardan estos en recorrer un determinado espacio. De esta forma se obtuvo, para cada muestra, un espectro en el que se representa la intensidad de cada ion, en función de su relación masa/carga (m/z). Esta relación es conocida como huella peptídica, y se contrastó con la base de datos Swiss-Prot 57.15, dando lugar a la identificación de la proteína. Además, para evitar errores de identificación, se hizo una doble fragmentación MS/MS en los picos de interés.

4.6 Técnicas De Validación

La validación de los resultados obtenidos por proteómica se realizó principalmente mediante la utilización de dos técnicas, el ELISA y el Western-Blot.

4.6.1 Cuantificación de los niveles de proteína séricos

- ELISA (del inglés, *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*; ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas); es un método de análisis cuantitativo, ya que permite medir la concentración de una determinada proteína en una muestra. En todos los casos se utilizaron ELISAS comerciales tipo sándwich (**Tabla 6**), es decir, la placa está cubierta con el anticuerpo correspondiente, de modo que al añadir la muestra la proteína de interés queda retenida. Posteriormente se añade otro anticuerpo que también reconoce a nuestro antígeno y se une a él. El segundo anticuerpo tiene unido una enzima que reaccionará con otro sustrato específico, para dar lugar a un cambio de color detectable por colorimetría.

Tabla 6. Kits ELISA utilizados

Proteína	Referencia	Límite de detección
Apo E	Ray-Bio / ELH-Apo E	1.5 ng/mL
Apo A-I	Assay Pro / EA5201-1	0.7 µg/mL
LCAT	Bio Vendor / RD191122200R	0.27 ng/mL
IGF-I	Mediagnost / IFG-I ELISA E20	2.0 ng/mL

Apo; Apolipoproteína, LCAT; Lecitín Colesterol Acil Transferasa, IGF-I; del inglés, Insulin-like growth factor

- Multiplex; se trata de un inmunoensayo utilizado para el análisis masivo de proteínas mediante el uso de partículas magnéticas. Cada partícula magnética está asociada a un código de color y se conjuga con los anticuerpos específicos del analito permitiendo así la medida simultánea de varios

analitos en el mismo pocillo. En todos los casos se utilizaron ensayos multiplex de la casa Bio-Rad (BioPlex; **Tabla 7**)

Tabla 7. Diferentes Kits BioPlex utilizados.

Nombre	Referencia	Analitos
37-Plex Inflamación	171AL001M	APRIL / TNFSF13, BAFF / TNFSF13B, sCD30 / TNFRSF8, sCD163, Chitinase-3-like 1, gp130 / sIL-6R β , IFN- α 2, IFN- β , IFN- γ , IL-2, sIL-6R α , IL-8, IL-10, IL-11, IL-12 (p40), IL-10 (P70), IL-19, , IL-20, , IL-22, , IL-26, IL-27, , IL-28, IL-29, IL-32, IL-34, IL-35, TNFSF14 MMP-1, MMP-2, MMP-3, Osteocalcina, Osteopontina, Pentraxina-3, sTNF-R1, sTNF-R2, TSLP, TNFSF12
10-Plex Diabetes	171A7001M	Péptido-C, Grelina, GIP, GLP-1, Glucagón, Insulina, Leptina, PAI-1, Resistina, Visfatina
2-plex Diabetes	171A7002M	Adipsina, adiponectina

4.6.2 Western-blot (WB)

Se trata de un método de análisis semicuantitativo, ya que se mide la cantidad relativa de una proteína en los diferentes individuos. Para esta técnica la muestra es tratada de forma equivalente a como se había hecho en la 2DE, pero en este caso la muestra es resuspendida en un tampón de Tris-HCL 125 mM y se la añade una solución de carga al 6% con/sin β -mercaptoetanol, en función de si eran condiciones desnaturizantes o no desnaturizantes (Tris_HCl 125mM, SDS 2% (p/v), Glicerol 5% (v/v), azul de bromofenol 0,003% (p/v) y H₂O; pH 6,8). En el caso de las condiciones desnaturizantes las muestras fueron incubadas durante 5 minutos a 95°C antes de ser sometidas a una electroforesis unidimensional en geles SDS-PAGE. Las proteínas del gel fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa durante 2 h a 400 mA y a 4°C. Para confirmar que las proteínas se habían transferido correctamente, las membranas fueron teñidas con una solución de Ponceau (tris 0.1M, NaCL 1M, 0.05% Tween-20 y pH 7.4).

Las membranas fueron bloqueadas durante mínimo 1 h a temperatura ambiente en agitación, con 10 ml de solución de bloqueo (5% de leche desnatada o de albúmina de suero bovino en tampón TBS 1X y Tween-20 al 0.05%) para evitar uniones inespecíficas. Seguidamente se incubaron con el anticuerpo primario diluido en la solución de bloqueo durante toda la noche en agitación suave y a 4°C. Los anticuerpos primarios utilizados se detallan en la **Tabla 8**. Posteriormente, las membranas se lavaron con la solución de TBS-Tween y se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente (todos de Dako), diluido 1/1000 nuevamente en la solución de bloqueo, durante 1h a temperatura ambiente.

La señal de la proteína se detectó mediante quimioluminiscencia utilizando el sistema de la reacción peroxidasa (SuperSignal chemiluminescence system, Pierce), y la imagen se obtuvo con el ChemiDoc™XRS system (Bio Rad). Finalmente las bandas se analizaron con el programa ImageLab (Bio Rad), normalizando entre muestras por cantidad proteína total y entre diferentes membranas añadiendo a cada una de ellas un pool de muestras común.

Tabla 8. Anticuerpos utilizados para WB

Anticuerpos primarios			
Antígeno	Referencia	Especie	Dilución
SAP	Abcam / ab27313	Mouse	1:2000
Complemento C4A	Novus / NBP2-14,893	Rabbit	1:1000
TF		Goat	1:1000
Endostatina	Abcam / ab84250	Rabbit	1:1000
Anticuerpos secundarios			
Anti-goat HRP	Dako	Rabbit	1:10000
Anti-Rabbit HRP	Dako	Goat	1:10000
Anti-Mouse HRP	Dako	Rabbit	1:10000

5. TEJIDO ADIPOSEO

5.1 Obtención de las muestras

En esta tesis se han utilizado muestras de tejido adiposo subcutáneo, visceral, pericárdico y epicárdico de diferentes pacientes. Los tejidos visceral y subcutáneo se obtuvieron en operaciones de By-pass gástrico en la clínica Teknon, Barcelona. Las muestras de tejido adiposo cardiaco en cambio, se obtuvieron a partir de corazones de pacientes trasplantados justo en el momento de extracción en el hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona.

Las muestras de tejido adiposo destinadas al aislamiento de proteína y RNA fueron congeladas instantáneamente en nitrógeno líquido, y conservadas a -80°C hasta su utilización.

Para la obtención de células madre derivadas del tejido adiposo (del inglés, *Adipose Stem Cells*; ASC), el tejido adiposo fue transportado en medio de cultivo (Dulbecco's Modified Eagle Medium-DMEM con un 2% de penicilina/estreptomicina, Gibco, Life Technologies), hasta el aislamiento de las células.

5.1.1 Obtención de las células madre del tejido adiposo (ASC)

Se aislaron ASC de la grasa tanto coronaria como del ápex del corazón de pacientes sometidos a un trasplante de corazón, así como de la grasa subcutánea y visceral de pacientes sometidos a by-pass gástrico.

Se utilizaron las siguientes soluciones:

-PBS 1x (del inglés, Phosphate buffered saline).

- Medio de digestión (DMEM + Colagenasa I-A, 1mg/ml; Sigma Aldrich)

-Medio completo (DMEM + 20% de suero fetal bobino – FBS + 1% de penicilina/estreptomicina; Gibco, Life Technologies).

El protocolo que se siguió fue el siguiente (**Figura 24**):

- i. El tejido adiposo se limpió de restos de sangre en una solución de PBS con antibiótico y se eliminaron los posibles vasos sanguíneos. Se pesó el tejido.
- ii. Se introdujo el tejido en medio de digestión y se procedió a la realización de una digestión mecánica ayudada de tijeras y bisturí.
- iii. Se procedió a la digestión de las muestras en un horno giratorio precalentado a 37°C durante 1 hora.
- iv. Una vez transcurrido el tiempo de digestión, la collagenasa se inactivó añadiendo FBS.
- v. Cada una de las muestras fue transferida a un nuevo falcon. Para ello previamente se hizo pasar la muestra por un filtro de 100µm para eliminar los restos de tejido.

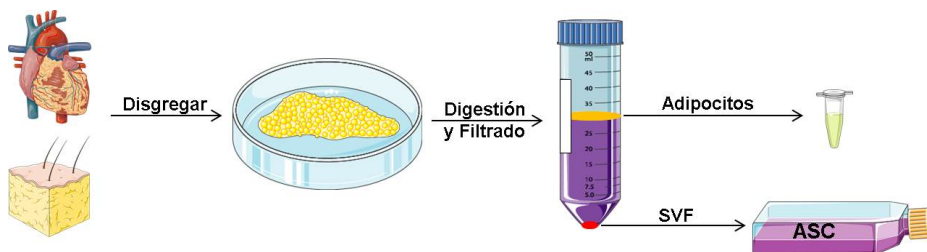


Figura 24. Esquema del procedimiento utilizado para el aislamiento de las ASC a partir de una muestra de tejido adiposo. ASC; células derivadas del tejido adiposo, del inglés, *Adipose Stem Cells*. SVF; fracción vascular del estroma, del inglés, *Stromal Vascular Fraction*.

- vi. Se centrifugó la muestra 10 minutos, 1200rpm, 22°C para separar los adipocitos, que quedan flotando en la parte superior, de la SVF que se queda al fondo en forma de pellet.

vii. Los adipocitos son aislados en un tubo cuidadosamente y congelados a -80°C . Una vez eliminado el sobrenadante, el pellet de SVF es resuspendido en medio completo.

viii. Las células fueron cultivadas bajo unas condiciones determinadas en una cámara de hipoxia (Hypoxic/Anoxic Workstation H35 de Don Whitely Scientific Ltd.) con una mezcla de gases de 1% O_2 , 5% de CO_2 y 94% de N_2 .

ix. Al día siguiente, se realizaron dos lavados con PBS para eliminar los restos de células no adheridas, las células adheridas serán las ASC que se encuentran en P0. Se dejan crecer cambiando el medio cada 2/3 días.

x. Una vez las células llegan a subconfluencia (75-90%), las células fueron levantadas y resembradas en un flask de 75 cm^2 para la expansión de las células. Para levantar las células se utilizó una solución de Tripsina-EDTA (Sigma-Aldrich).

xi. Una vez llegaron a subconfluencia nuevamente, las células fueron nuevamente levantadas y congeladas en N_2 líquido hasta su posterior utilización. Las células fueron congeladas en medio de congelación (FBS + Dimetil sulfóxido 7,5%; 1×10^6 cel/ml de medio).

5.1.2 Aislamiento de las microvesículas derivadas de las ASC

Para el aislamiento de las microvesículas derivadas de las ASC, se sembraron las células y se recogió el sobrenadante celular tras 48 horas de cultivo (**Figura 25**).

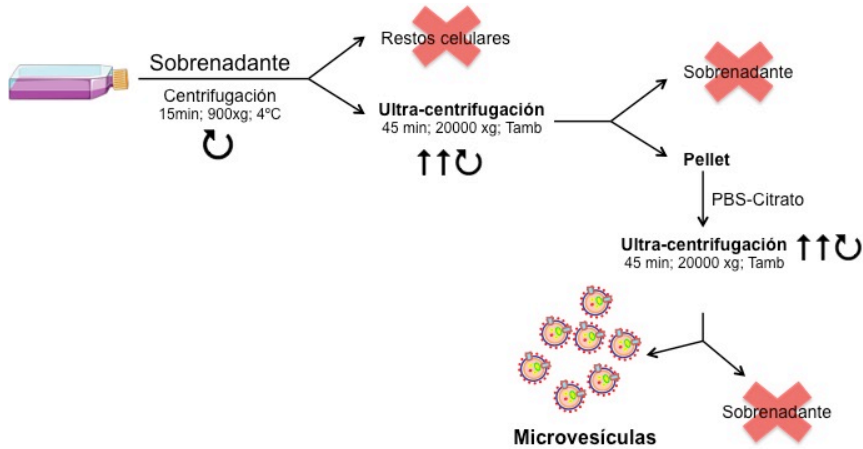


Figura 25. Esquema del procedimiento utilizado para el aislamiento de las microvesículas a partir de medio de cultivo.

Primero se realizó una centrifugación de 15 minutos, a 900xg y T ambiente, para así eliminar los restos celulares. Se descartó el pellet y se ultracentrifugó el sobrenadante a 20000 xg durante 45 minutos. Tras eliminar el sobrenadante, el pellet se lavó con una solución de PBS-citrato (Fosfato 1.4 mmol/l, NaCl 154 mmol/l, citrato trisódico 10.9 mM, pH 7.4) y se repitió la centrifugación a 20000 xg, durante 45 minutos. Finalmente este pellet se resuspende en el tampón adecuado para la finalidad de las microvesículas (mRNA&miRNA: Quiazol; Citometría de flujo: PBS-citrato; cultivo celular: Medio de cultivo).

6. ENSAYOS DE BIOLOGÍA CELULAR

6.1 Otros tipos de células utilizados

6.1.1 HMEC

Las HMEC, o células humanas endoteliales micro-vasculares (del inglés, Human microvascular endotelial cells) provienen de una línea celular inmortalizada adquirida del centro de control de enfermedades de Atlanta. Estas células son cultivadas con medio MCDB131 (Invitrogen) y suplementado con FBS 10%, Glutamina 2 mM (Invitrogen) y gentamicina 50 mg/ml (Invitrogen).

6.2 Citometría de Flujo

La citometría de flujo es un método analítico que permite la medición rápida de ciertas características físicas y químicas de células o partículas suspendidas en líquido que producen una señal de forma individual al interferir con una fuente de luz. Una de las características analíticas más importantes de los citómetros de flujo es su capacidad de medir múltiples parámetros celulares, como el tamaño, forma y complejidad así como cualquier componente celular o función que pueda ser marcada con un fluorocromo.

El fundamento de esta técnica se basa en hacer pasar una suspensión de partículas 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.

En este estudio se analizó la presencia de marcadores de superficie característicos de las células mesenquimales tanto en el SVF como en las células en P3. Para ello se analizaron un mínimo de 100.000 células

tanto en el caso del SVF como en el caso de las células en fase 3. Las células fueron resuspendidas en buffer de citometría formada por una solución de PBS con 0.1% de albúmina sérica bovina (Nzytech) y 0.1% de azida sódica (Sigma-Aldrich). Las muestras se incubaron con los anticuerpos correspondientes durante 30 minutos a 4°C, protegidos de la luz, se añadieron 250 µL de buffer de citometría y se analizaron en un citómetro de flujo Coulter EpicsXL con el programa Expo 32 ADC XL 4 color (Beckman Coulter). En el caso de las células del SVF se añadió un paso previo al análisis de lisado de los eritrocitos. Para ello se añadieron 250 µL de QuickLysis (Cytognos) y se incubó la muestra durante otros 15 minutos. Se analizaron marcadores característicos de las ASC, así como anticuerpos negativos de estas mismas células. Además, se realizaron controles de isotipo para cada anticuerpo (**Tabla 9**).

Para el análisis de microvesículas el protocolo es diferente. En primer lugar se hace un marcaje con Anexina V para así poder calcular el número total de microvesículas. A su vez, puede medirse algún otro anticuerpo. En esta tesis hemos analizado conjuntamente Anexina V y factor tisular (TF). Para ello, las µVs fueron extraídas en PBS-citrato e incubadas con los anticuerpos conjugados anti-Anexina V y anti-TF. Las muestras se diluyeron con “Annexin Binding Buffer” (BD Bioscience; del inglés, buffer de unión a Anexina) para así parar la reacción y posteriormente fueron analizadas con el citómetro FACSCantoII™ (BD Bioscience).

MATERIALES Y MÉTODOS

Tabla 9. Anticuerpos utilizados para la caracterización por citometría de flujo de las células madre mesenquimales provenientes del tejido adiposo.

	Anticuerpo	Referencia	Tipo de marcador
CD14	-	FITC 14F-100T Immunostep	Negativo ASC
CD 29	Integrina β 1	PE 555443 BD Bioscience	Positivo ASC
CD31	PECAM-1		Negativo ASC
CD 34	-	PC5 A07777 Beckman Coulter	Negativo ASC
CD 44	Receptor de la fibronectina	FITC 555478 BD Bioscience	Positivo ASC
CD 45	Antígeno leucocitario común	PE-Cy TM 5 555484 BD Bioscience	Negativo ASC
CD 73	Ecto-5'-nucleotidasa	FITC 561254 BD Bioscience	Positivo ASC
CD 90	Antígeno-1 de las células del timo	FITC 555595 BD Bioscience	Positivo ASC
CD105	Endoglina	PE 560839 BD Bioscience	Positivo ASC
Isotipo FITC	-	555748 BD Bioscience	-
Isotipo PE	-	555749 BD Bioscience	-
Isotipo PC5	-	A07798 Beckman Coulter	-
Isotipo PE-Cy TM 5	-	555750 BD Bioscience	-
Anexina V		ANXVCFB Immunostep	Positivo MVs
TF	Factor tisular	FITC 4508CJ Sekisui	-

6.3 Viabilidad y proliferación celular

La viabilidad celular se midió 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 las células que son metabólicamente activas, y por ello 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). De la reducción de este compuesto surge el Formazán, que es un compuesto soluble y que a una longitud de onda de 490 nm puede ser cuantificada. Por tanto, la cantidad de formazán es directamente proporcional al número de células vivas en cultivo.

En esta tesis analizamos la viabilidad de las células ASC cardíacas así

como las HMEC al ser suplementadas con μ Vs procedentes de ASC de diferentes tejidos y pacientes. Para ello se sembraron en triplicado 10^4 células en una placa de 96 pocillos y se dejaron crecer con su medio durante 24 horas. En el caso de las ASC cardiacas se añadieron directamente sobre el medio 10 μ l del reactivo MTS a cada pocillo y se incubó la reacción a 37°C durante 2 horas. En el caso de las HMEC, se eliminó el medio, se lavaron todos los pocillos con PBS y se añadió medio de cultivo suplementado con medio condicionado de las ASC dejándola incubarse otras 24 horas. Se añadieron entonces 10 μ l del reactivo MTS a cada pocillo y se incubó la placa a 37°C durante 2 horas. La cuantificación de la absorbancia a 490 nm se realizó en espectrofotómetro Spectramax 250 con el programa SoftMax (Molecular Devices)

6.4 Ensayo de migración celular in vitro

Se analizó la velocidad de migración de las células HMEC tratadas con μ Vs procedentes de ASC. Para ello se utilizaron placas específicas de migración (Culture-Insert μ -Dish 35mm low, Ibidi). Estas placas permiten sembrar dos regiones separadas de una placa dejando una separación de 500 μ m entre ambos campos gracias a un inserto de silicona biocompatible que forma dos pocillos rectangulares. En este ensayo se sembraron 2.5×10^5 células por campo y se dejaron adherirse y crecer durante 24 h. Tras 24 horas de cultivo de las células HMEC, el inserto fue retirado con ayuda de unas pinzas estériles. Entonces se eliminó el medio y se hizo un lavado con PBS para eliminar las posibles células muertas. Entonces se añadió medio suplementado con μ Vs de modo que ambos campos compartían el mismo medio y podían empezar a migrar un campo celular hacia el otro. Se realizaron fotos con un microscopio invertido ECLIPSE TS5100 (Nikon) y una cámara Moticom 10 (Motic) a las 0, 6, 8, 10 y 24h. El área cubierta por células se analizó

utilizando el programa ImageJ (**Figura 26**).



Figura 26. Ensayo de Migración. Detalle del procedimiento de siembra en placas ibidi Culture-Insert. Adaptado de www.ibidi.com

6.5 Ensayo de crecimiento celular

La cinética de crecimiento y el tiempo de duplicación celular se estudiaron mediante un ensayo denominado “Doubling time” (del inglés, tiempo de duplicación). Para ello, se sembraron 2×10^4 células en placas de 6 pocillos en medio normal de cultivo (DMEM LG, 10% FBS, 1% P/S). 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. Posteriormente se calculó el tiempo de duplicación celular (PDT, del inglés, *Population Doubling Time*) mediante la fórmula $PDT = Te / [(\log N2 - \log N1) / \log 2]$, donde Te es el tiempo (en días), N1 es el número de células al inicio y N2 es el número de células al final de la fase de crecimiento.

6.6 Angiogénesis in vitro

Para analizar el potencial de una célula a formar nuevas estructuras tubulares in vitro se utiliza una matriz tridimensional que permite a estas

células agruparse formando tubos y nodos. La matriz tridimensional utilizada en esta tesis es el Matrigel[®], una mezcla comercial que deriva de células de sarcoma de ratón y está compuesto por laminina, colágeno IV, 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.

Se trata de un ensayo sencillo y cuantificable para evaluar la capacidad de angiogénesis in vitro.

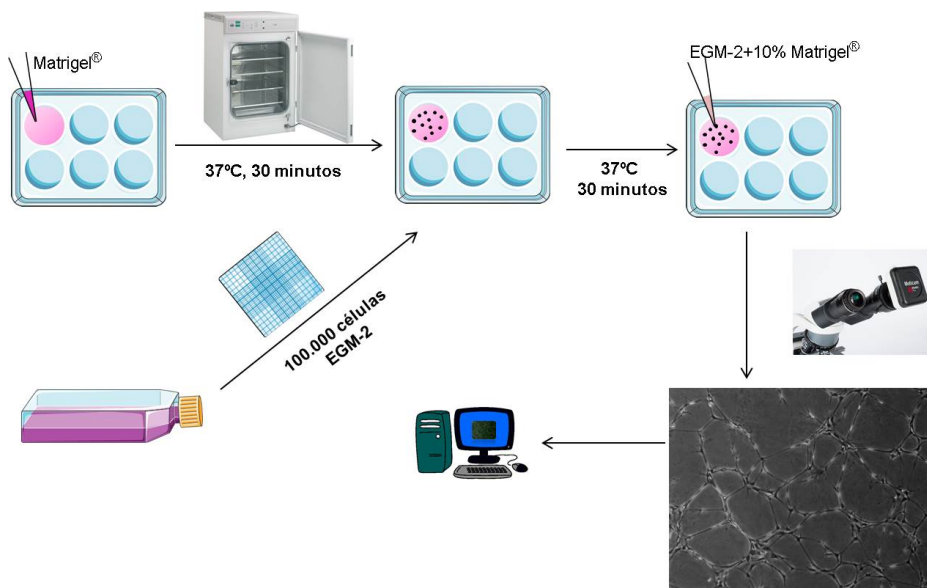


Figura 27. Angiogénesis in vivo. Representación esquemática del proceso de formación de tubos en una matriz tridimensional de Matrigel[®].

Para la realización de este ensayo se cubrieron placas de 24 mm con una fina capa de Matrigel[®], siempre en hielo ya que a 4°C es a la única temperatura que esta matriz es líquida, y se incubaron a 37°C durante 30min para su solidificación. Seguidamente se sembraron las células con 1mL del medio EGM-2 (del inglés, Endothelial Cell Growth Medium 2,

MATERIALES Y MÉTODOS

Lonza; **Tabla 10**) y se metieron las placas a la incubadora de CO₂ a 37°C durante 30min para permitir la adhesión de las células a la matriz. Pasado ese tiempo se añadió otro mL de medio suplementado con 10% de Matrigel® (**Figura 27**). La formación de tubos se analizó a las 24 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.

Tabla 10. Composición del medio EGM-2 utilizado para los ensayos de angiogénesis in vitro.

Componente	Porcentaje	Para 100 mL
Medio Base	-	98 mL
FBS	2%	2 mL
Hidrocortisona	0.04%	40 µL
hFGF-B	0.4%	400 µL
VEGF	0.1%	100 µL
R3-IGF-1	0.1%	100 µL
Ácido ascórbico	0.1%	100 µL
hEGF	0.1%	100 µL
Gentamicina	0.1%	100 µL
Heparina	0.1%	100 µL

FBS: Fetal bovine serum; hFGF-B: human basic fibroblast growth factor; VEGF: Vascular endothelial growth factor; R3-IGF-1: Insulin-like growth factor receptor 3; hEGF: Human endothelial growth factor.

7. ANÁLISIS DE LOS NIVELES DE mRNA Y miRNA

7.1 Obtención del mRNA y miRNA

7.1.1 Extracción de mRNA a partir de muestras de sangre

Para extraer mRNA a partir de muestras de sangre, se utilizaron tubos PAXgene™ (PreAnalytix, Qiagen/BD). Los tubos PAXgene™ contienen un anticoagulante que estabiliza la muestra y permite preservar el mRNA durante amplios periodos de tiempo. El mRNA se cuantificó y conservó a -80°C hasta su utilización.

7.1.2 Obtención de mRNA a partir de tejido

Para la extracción de mRNA a partir de tejido (corazón, duodeno, yeyuno e ileon), las muestras fueron machacadas y pulverizadas en N₂ líquido con ayuda de un mortero. Posteriormente, el RNA fue aislado utilizando el reactivo Tripure™ Isolation Reagen (Roche Molecular Biochemicals) de acuerdo con las instrucciones del proveedor.

En la extracción de mRNA de tejido adiposo, las muestras fueron igualmente machacadas y pulverizadas con N₂ líquido, pero en este caso la extracción se realizó utilizando el reactivo Qiazol seguido del RNeasy isolation kit según las instrucciones del proveedor (**Figura 28**). En ambos casos el mRNA se cuantificó y conservó a -80°C hasta su utilización.

7.1.3 Obtención de mRNA y microRNA a partir de un cultivo celular

Para aislar el RNA y el miRNA a partir de un cultivo celular, se utilizaron el RNeasy isolation kit (Qiagen) para el mRNA (**Figura 28**), y el mirVANA miRNA isolation kit (Thermofisher Scientific) para el microRNA siguiendo las instrucciones del fabricante. El mRNA se cuantificó y conservó a -80°C hasta su utilización. El miRNA por el contrario se conservó a -20°C.

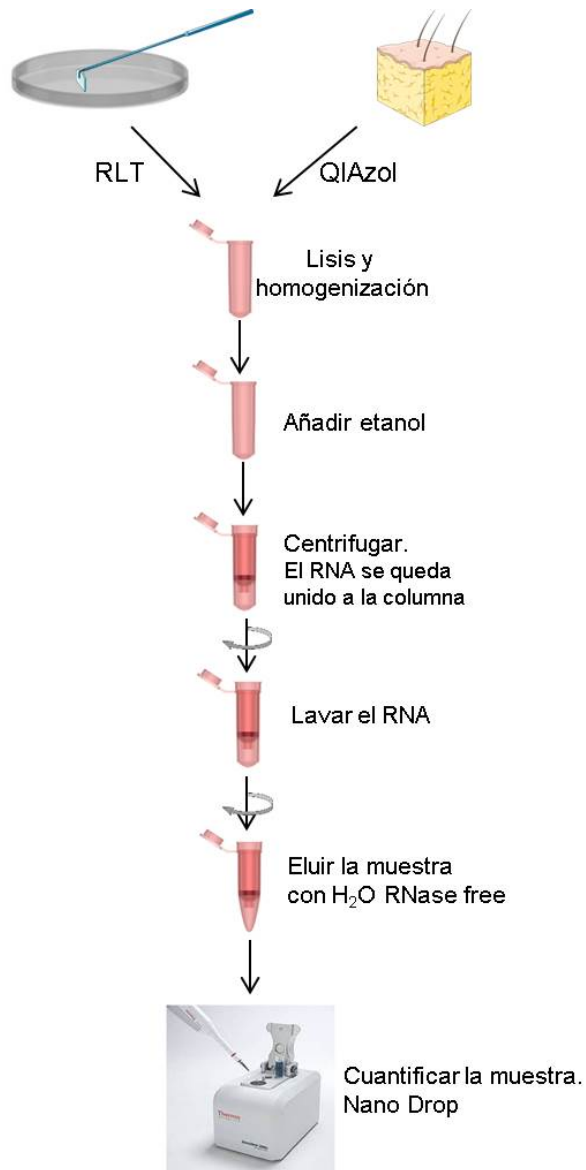


Figura 28. Extracción de RNA. Esquema resumen del proceso de extracción del RNA a partir de células y tejido adiposo.

7.2 Cuantificación del RNA

La concentración tanto de mRNA como de miRNA se determinó con el espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies), que permite determinar la concentración y pureza. 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 mRNA y miRNA se verificó mediante el cociente 260/280 (valor óptimo entre 1,7 y 2,0).

7.3 Síntesis del DNA complementario

7.3.1 Síntesis de cDNA a partir de mRNA

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 11**). En algún caso se realizó la síntesis de 0.5ug, ajustando la cantidad de los reactivos.

Tabla 11. Reactivos utilizados en la 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 ₂ O libre de RNasas	4,2 µl
RNA	1 µg en 10 µl
TOTAL	20 µl

Se utilizó el termociclador GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystem) con el programa especificado en la **Tabla 12**.

Tabla 12. Programa utilizado en el termociclador para la síntesis de DNA complementario

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

7.3.1 Síntesis de cDNA a partir de miRNA

Realizamos la síntesis de cDNA a partir de 10ng de miRNA. Esta síntesis consta de 4 pasos:

- **PolyA:** Poliadenilación del extremo 3' del RNA para ayudar a su estabilización y así mejorar la eficacia de la transcripción. Los reactivos necesarios se indican en la **tabla 13**.

-

Tabla 13. Reactivos de la reacción polyA

Compuesto	Volumen/muestra
10X PolyA Buffer	0.5 uL
ATP	0.5 uL
PolyA Enzyme	0.3 uL
RNase free H2O	1.35 uL
RNase Inhibitor	0.05 uL
miRNA	2 uL
Total	5.0 uL

Esta mix se incuba a 37°C para que la reacción de poliadenilación tenga lugar y posteriormente se para la reacción dejando la muestra 10 minutos a 65°C. La muestra se conserva a 4°C hasta que se continúa con la siguiente reacción.

- **Ligación:** Sobre el tubo se la reacción de polyA añadimos 10uL de la siguiente mix:

Tabla 14. Reactivos de la reacción de ligación.

Compuesto	Volumen
5X DNA Ligase Buffer	3uL
50% PEG 8000	4.5uL
25X Ligation adaptor	0.6uL
RNA Ligase	1.5uL
RNase free H2O	0.4uL
Total	10uL

Esta mix se incuba a 16°C para que la reacción de ligación tenga lugar y posteriormente se conserva a 4°C hasta que se continúa con la siguiente reacción.

-**Trascricpción reversa:** Sobre el tubo se la reacción de ligación añadimos 15 uL de la siguiente mix:

Tabla 15. Reactivos de la transcripción reversa.

Compuesto	Volumen
5X RT Buffer	6uL
dNTP mix (25nM each)	1.2uL
20X Universal RT Primer	1.5uL
10X RT Enzyme Mix	3uL
RNase free H2O	3.5uL
Total	15uL

Esta mix se incuba a 42°C durante 15 minutos para que la reacción de transcripción tenga lugar y posteriormente se para la reacción dejando la

muestra 10 minutos a 85°C. La muestra se conserva a 4°C hasta que se continúa con la siguiente reacción.

- **miR-Amp reaction:** Reacción de amplificación.

Tabla 16. Reactivos de la reacción de amplificación

Compuesto	Volumen/muestra
2X miR-Amp Master Mix	25 uL
20X miR-Amp Primer Mix	2.5 uL
RNase free H2O	17.5 uL
Total	45 uL

Esta mix se incuba 5 minutos a 95°C para que se produzca la activación de la enzima, posteriormente se realizan 14 ciclos de desnaturalización-anillamiento (95°C-3seg seguido se 60°C-30seg) y se para la reacción a 99°C a 10 minutos. La muestra se conserva a -20°C hasta su utilización.

7.4 PCR a tiempo real

7.4.1 PCR para muestras de mRNA

La expresión relativa de mRNA de los genes estudiados fue determinada mediante PCR a tiempo real con el método de SensiFAST™ Probe Hi-ROX kit (Ecogene), el equipo de detección ABIPRISM 7900HT y el programa SDS 2.4 (Applied Biosystems). De esta forma se mide a tiempo real la amplificación del gen de interés y se mide su expresión por fluorescencia. Se utilizaron placas de 384 pocillos, en las que se cargaron en duplicado 9µl por pocillo de la mezcla de muestra y gen que se detalla a continuación (**Tabla 17**).

Tabla 17. Reactivos utilizados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

SensiFast™ Probe Hi-ROX PCR Master Mix 2X	10 µl
TaqMan® Assay 20X	1 µl
H2O libre de RNasas	7 µl
cDNA	2 µl
TOTAL	20 µl

En todos los análisis de PCR a tiempo real se utilizaron como genes endógenos control el GAPDH (Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa) en muestras humanas y el RPLP0 (Proteína ácida 60S ribosomal P0) en muestras de rata, para normalizar la expresión de los diferentes genes ya que se considera que la expresión de estos genes es constante e independiente de las condiciones experimentales. Se utilizó el siguiente programa de amplificación:

- Activación de la enzima: 2 min a 95°C

- Amplificación: 40 ciclos:

I) 95°C, 10 seg

II) 60°C, 30 seg

7.5.2 PCR para miRNA

En el caso de los miRNA es necesario hacer una dilución 1/10 de la muestra. Al igual que en el caso de RNA se utiliza el equipo de detección ABIPRISM 7900HT y el programa SDS 2.4 (Applied Biosystems), pero en este caso los reactivos son diferentes y están descritos en la **Tabla 18**.

MATERIALES Y MÉTODOS

Tabla 18. Reactivos utilizados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para miRNA.

Compuesto	Volumen
TaqMan® Fast Advanced Master Mix (2X)	10uL
TaqMan® Advanced miRNA Assay (20X)	1uL
RNase-free water	4uL
cDNA	5uL
Total PCR Reaction Mix	20uL

Cargamos en duplicado una placa de 96 pocillos con 9uL de muestra en cada pocillo y corremos la PCR con las siguientes condiciones:

-Activación de la enzima: 95°C, 20 segundos

- Amplificación: 40 ciclos;

I) 95°C, 3seg

II) 60°C, 30 seg.

RESULTADOS

ARTÍCULO 1

“Phytosterols and Omega 3 supplementation exert novel regulatory effects on metabolic and inflammatory pathways: A proteomic study”

Carmen Lambert^{1,†}, Judit Cubedo^{1,2,†}, Teresa Padró^{1,2}, Joan Sánchez-Hernández^{3,4}, Rosa M. Antonijuan⁵, Antonio Pérez⁴ and Lina Badimon^{1,2,6}

¹ Cardiovascular Science Institute—ICCC IIB-Sant Pau, 08025 Barcelona, Spain;

² Ciber CV, 28029 Madrid, Spain

³ Ciber DEM, 28029 Madrid, Spain.

⁴ Endocrinology Department, Hospital Sant Pau, IIB-Sant Pau, 08025 Barcelona, Spain.

⁵ Medicament Research Center (CIM), Hospital Sant Pau, IIB-Sant Pau, 08025 Barcelona, Spain.

⁶ Cardiovascular Research Chair UAB, 08025 Barcelona, Spain.

† These authors contributed equally to this study.

Nutrients. June 2017, 9(6). pii: E599.

doi: 10.3390/nu9060599.

Factor de impacto (2017): 4.196

RESUMEN

La suplementación con fitoesteroles y omega 3 induce un novedoso efecto regulatorio en las vías metabólicas e inflamatorias: Un estudio proteómico

La enfermedad cardiovascular (ECV) sigue siendo una de las principales causas de muerte y discapacidad en todo el mundo.

RESULTADOS

Además del tratamiento farmacológico, las intervenciones nutricionales o las suplementaciones alimentarias se están convirtiendo en una estrategia de salud para la prevención de las ECV. Los fitoesteroles (PhyS) son componentes naturales que se ha demostrado que reducen los niveles de colesterol; mientras que los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA), principalmente los ácidos grasos omega-3 (ω 3), han demostrado reducir los niveles de triglicéridos. El objetivo de este artículo es investigar si las proteínas que componen las lipoproteínas principales (lipoproteínas de baja densidad (LDL) y lipoproteínas de alta densidad (HDL)) así como las proteínas en la fracción de plasma libre de lípidos (LPDP), están reguladas por la ingesta de leche suplementada con PhyS u Omega-3 en voluntarios sanos con sobrepeso. Para ello se ha utilizado un enfoque de biología de sistemas basado en la proteómica. El estudio fue un ensayo cruzado longitudinal, que incluyó a treinta y dos voluntarios sanos con un índice de masa corporal (IMC) de 25-35 kg/m² (Ensayo clínico: ISRCTN78753338). Se analizaron muestras basales antes de cualquier intervención y después de 4 semanas de ingesta de leche suplementada con PhyS u Omega-3. Se realizaron perfiles proteómicos mediante electroforesis bidimensional (2-DE) seguido de espectrometría de masas (MALDI / TOF), ELISA, Western blot, análisis bioquímico convencional y bioinformática in silico. La ingesta de leche con PhyS no indujo cambios en la fracción proteica del plasma asociada a lípidos, mientras que la leche con ω 3 aumentó significativamente el contenido de Apo E de las LDL ($p = 0.043$) e indujo un aumento coordinado en varias proteínas asociadas a las HDL; Apo A-I, lecitin colesterol aciltransferasa (LCAT), paraoxonasa-1 (PON-1), Apo D y Apo L1 ($p < 0.05$ para todos). Curiosamente, la ingesta de leche con PhyS indujo una reducción en diversas moléculas inflamatorias. Este cambio no fue observado tras la ingesta de leche suplementada con ω 3. El componente P sérico amiloide

(SAP), se redujo en la fracción proteica LPDP ($p = 0.001$) de los sujetos que tomaron leche suplementada con PhyS. Además, la expresión del ligando de quimioquina 2 (CCL2), detectada mediante análisis de reacción en cadena de la polimerasa inversa (RT-PCR) en las células blancas de la sangre, se redujo significativamente ($p = 0,013$). No se observaron cambios en el proteoma de plasma libre de lípidos con leche suplementada con $\omega 3$. Nuestro estudio proporciona resultados novedosos y destaca que la leche suplementada con PhyS induce la atenuación de las vías proinflamatorias, mientras que la leche con $\omega 3$ provoca una mejora en las vías metabólicas de los lípidos.



Article

Phytosterols and Omega 3 Supplementation Exert Novel Regulatory Effects on Metabolic and Inflammatory Pathways: A Proteomic Study

Carmen Lambert ^{1,†}, Judit Cubedo ^{1,2,†}, Teresa Padró ^{1,2}, Joan Sánchez-Hernández ^{3,4}, Rosa M. Antonijoan ⁵, Antonio Perez ⁴ and Lina Badimon ^{1,2,6,*}

¹ Cardiovascular Science Institute—ICCC IIB-Sant Pau, 08025 Barcelona, Spain; clambert@santpau.cat (C.L.); jcubedo@csic-iccc.org (J.C.); tpadro@csic-iccc.org (T.P.)

² Ciber CV, 28029 Madrid, Spain

³ Ciber DEM, 28029 Madrid, Spain; jsanchezh@comb.cat

⁴ Endocrinology Department, Hospital Sant Pau, IIB-Sant Pau, 08025 Barcelona, Spain; APerez@santpau.cat

⁵ Medicament ResearchCenter (CIM), Hospital Sant Pau, IIB-Sant Pau, 08025 Barcelona, Spain; rantonijoana@santpau.cat

⁶ Cardiovascular Research Chair UAB, 08025 Barcelona, Spain

* Correspondence: lbadimon@csic-iccc.org; Tel.: +34-93-556-5882

† These authors contributed equally to this study.

Received: 20 April 2017; Accepted: 8 June 2017; Published: 13 June 2017

Abstract: Cardiovascular disease (CVD) remains one of the major causes of death and disability worldwide. In addition to drug treatment, nutritional interventions or supplementations are becoming a health strategy for CVD prevention. Phytosterols (PhyS) are natural components that have been shown to reduce cholesterol levels; while poly-unsaturated fatty acids (PUFA), mainly omega-3 (ω 3) fatty acids, have shown to reduce triglyceride levels. Here we aimed to investigate whether the proteins in the main lipoproteins (low density lipoproteins (LDL) and high density lipoproteins (HDL)) as well as proteins in the lipid free plasma fraction (LPDP) were regulated by the intake of PhyS-milk or ω 3-milk, in overweight healthy volunteers by a proteomic based systems biology approach. The study was a longitudinal crossover trial, including thirty-two healthy volunteers with body mass index (BMI) 25–35 kg/m² (Clinical Trial: ISRCTN78753338). Basal samples before any intervention and after 4 weeks of intake of PhyS or ω 3-milk were analyzed. Proteomic profiling by two dimensional electrophoresis (2-DE) followed by mass spectrometry-(MALDI/TOF), ELISA, Western blot, conventional biochemical analysis, and in-silico bioinformatics were performed. The intake of PhyS-milk did not induce changes in the lipid associated plasma protein fraction, whereas ω 3-milk significantly increased apolipoprotein (Apo)- E LDL content ($p = 0.043$) and induced a coordinated increase in several HDL-associated proteins, Apo A-I, lecithin cholesterol acyltransferase (LCAT), paraoxonase-1 (PON-1), Apo D, and Apo L1 ($p < 0.05$ for all). Interestingly, PhyS-milk intake induced a reduction in inflammatory molecules not seen after ω 3-milk intake. Serum amyloid P component (SAP) was reduced in the LPDP protein fraction ($p = 0.001$) of subjects taking PhyS-milk and C-C motif chemokine 2 (CCL2) expression detected by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis in white blood cells was significantly reduced ($p = 0.013$). No changes were observed in the lipid-free plasma proteome with ω 3-milk. Our study provides novel results and highlights that the PhyS-milk induces attenuation of the pro-inflammatory pathways, whereas ω 3-milk induces improvement in lipid metabolic pathways.

Keywords: phytosterols; omega 3; HDL; LDL; inflammation; lipid metabolism

1. Introduction

Cardiovascular disease (CVD) is a very common pathology that is the main cause of death and disability worldwide. The reduction of CVD risk is one of the major challenges of cardiovascular medicine.

Nowadays, the incidence of overweight and obesity is increasing, becoming an important risk factor for a number of diseases including atherosclerosis and CVD [1]. Moreover, several studies have demonstrated, and it is generally acknowledged, that lifestyle and nutritional habits are closely associated with the presentation of CVD [2–4].

A very common therapeutic strategy for the prevention of CVD is nutritional intervention or supplementation. The cardioprotective effects of poly-unsaturated fatty acids (PUFA) intake have been examined in several studies, which have established that diets enriched in omega 3 poly-unsaturated fatty acids (ω 3-PUFA) from plants and fish have an important role in the prevention of CVD [5,6]. Some of the beneficial effects of PUFA rich foods include a reduced susceptibility to suffer from ventricular arrhythmia, antithrombogenic and antioxidant effects, retardation of atherosclerotic plaque growth, improved blood lipid and lipoprotein profile, and also anti-inflammatory and hypotensive effects. PUFA supplemented foods have been shown to reduce triglyceride (TG) levels [7]. Additionally, dietary supplementation with phytosterols (PhyS) has been shown to reduce the risk of CVD and it is a common nutritional strategy to reduce cholesterol levels [8].

Among the different lipid-associated plasma fractions, low-density lipoproteins (LDL) and high-density lipoproteins (HDL) are widely studied. In primary prevention, high levels of LDL-cholesterol (LDL-C) are related with a higher incidence of cardiovascular events in the continuum of CVD, whereas HDL-cholesterol (HDL-C) levels are commonly known as a risk-reducing factor [9]. It is now accepted that the importance of HDL in the progression of CVD, resides on their quality rather than their quantity, highlighting the importance of their composition, structure, and function [10–13]. Indeed, apolipoprotein A-I (Apo A-I), the major protein component of HDL, has cardiovascular protective properties [14,15]. Also, low levels of apolipoprotein E (Apo E) have been related to hyperlipidemia and atherosclerosis [16].

In addition to apolipoproteins, HDL-associated enzymes such as paraoxonase-1 (PON-1) and lecithin cholesterol acyltransferase (LCAT) exert antioxidant and cardioprotective effects [17]. In fact, the association of LCAT, PON-1, and Apo A-I have been shown to increase the time span of HDL protection against LDL oxidation [18].

Beside lipid metabolism, another key hallmark in the pathogenesis of atherosclerotic disease is inflammation. One of the main protein families involved in systemic inflammation are pentraxins [19]. Pentraxins are serum proteins with a relatively uncommon pentameric structure, which have a common amino acid domain in the C-terminal region (pentraxin signature), and besides their role in inflammation they also have a role in immunity and homeostasis [20,21]. Depending on the length of the amino acid chain, pentraxins are divided in two subfamilies, long pentraxins and short pentraxins. Members of the short pentraxins include C-reactive protein (CRP) and serum amyloid P component (SAP), which are acute-phase proteins secreted mainly by hepatocytes in response to pro-inflammatory stimuli. In fact, the role of CRP as a risk marker for atherosclerosis has been widely studied [21].

Our group has previously demonstrated that the intake of low fat milk supplemented with PhyS reduces plasma cholesterol levels; whereas ω 3 supplementation reduces plasma TG and very-low density lipoprotein (VLDL) cholesterol levels [7]. Additionally, PhyS and ω 3 supplementation induce a differential shift in the LDL lipidomic profile [7]. In the present study, we aimed to further characterize and extend PhyS and ω 3 induced changes by analyzing the differential proteomic profile of the lipid-associated plasma protein fraction (LDL and HDL) and the soluble protein fraction of plasma (LPDP) in a subgroup of subjects of our previously reported study, in order to broaden our in-depth understanding of the effect of these food supplements and evidence further effects at a molecular level that could provide CVD protection.

2. Materials and Methods

2.1. Study Population

This is a sub-study of a previously reported double-blinded randomized two-arm longitudinal crossover trial [Clinical Trial: ISRCTN78753338] [7]. All subjects were submitted to two 28-day intervention periods in which volunteers were instructed to consume 250 mL of ω 3-supplemented milk (131.25 mg EPA + 243.75 mg DHA/250 mL of milk) or PhyS-supplemented milk (1.6 g of plant sterols/250 mL of milk), separated by a 4 weeks wash-out period (Figure 1a). Both products were prepared by CAPSA Food (Spain) and with no identification of the product administered. PhyS-milk was commercially available, whereas ω 3-milk was prepared for the study. Before the initiation of the intervention, individuals were submitted to a 2 weeks run-in period. During the run-in and wash-out periods, participants received a commercially available plain low-fat milk (without PhyS or ω 3), with the same composition to that used for preparing the PhyS- and ω 3-enriched milks. These basal samples are used as self-control to avoid variability between volunteers. The trial demonstrated that milk-supplementation with 1.6 g of PhyS significantly reduces LDL-C and milk with 375 mg of ω 3 significantly reduces TG levels [7].

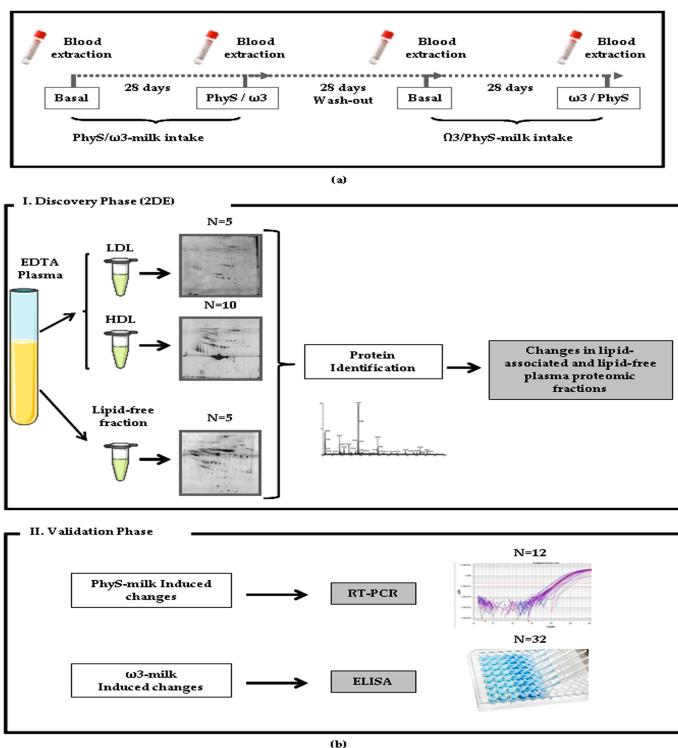


Figure 1. Study design. (a) Blood samples were obtained before and after the 28 day milk supplementation treatment period. A 28 day wash-out was made between treatments; (b) The study workflow of the present study comprised two phases: (I) the discovery phase in which a proteomic approach was used to identify changes in the proteomic profile of the different plasma fractions after the intake of supplemented milk (N = 5); and (II) the validation phase, where different selected proteins were validated by ELISA (N = 32) and inflammatory changes were analyzed by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR; N = 12).

Healthy volunteers between the ages of 25 and 70 years ($N = 32$), attending to regular medical controls, were eligible for participation if they had overweight or grade 1 obesity (BMI 25–35 kg/m²; Table 1). Subjects were excluded if they reported existing chronic illnesses including cancer, overt hyperlipidemia, diabetes mellitus, hypertension, or heart, liver, or kidney disease. Volunteers were excluded if they were under anti-inflammatory medication or any blood thinning treatment during the study or during the 2-weeks run-in period. Other exclusion criteria were: use of lipid-lowering drugs, β -blockers, or diuretics, history of CVD, lactose intolerance, or being in a weight-loss program. To confirm health status, all subjects underwent a complete physical examination conducted by the physician of the study. Those consuming a PhyS-enriched spread and/or fish oil supplements or with strong aversion to milk derived products were also excluded. Compliance was controlled by telephone and personal interview and with a written formulary on each period. The Human Ethical Review Committee of the Hospital Sant Pau in Barcelona approved the study. Informed written consent was obtained from all participants. Reporting of the study conforms to the STROBE (strengthening the reporting of observational studies in epidemiology)-guidelines.

Table 1. Demographic and biochemical profile.

Product	PhyS-Milk		ω 3-Milk	
Women/Men	19/13		19/13	
Age (Years)	50.5 \pm 1.6		50.5 \pm 1.6	
Parameter	Baseline	After PhyS-milk	Baseline	After ω 3-milk
BMI	28.2 \pm 0.7	28.1 \pm 0.7	28.3 \pm 0.7	28.2 \pm 0.7
Ch (mg/dL)	216.0 \pm 6.0	204.5 \pm 5.6 *	216.4 \pm 6.1	213.78 \pm 5.9
TG (mg/dL)	110.2 \pm 10.3	115.2 \pm 15.1	116.3 \pm 14.3	99.5 \pm 8.7 *
HDL-C (mg/dL)	54.5 \pm 3.1	54.5 \pm 3.0	57.0 \pm 2.9	56.4 \pm 2.8
LDL-C (mg/dL)	137.7 \pm 4.9	127.2 \pm 4.7 *	136.4 \pm 5.0	137.7 \pm 5.0
VLDL-C (mg/dL)	22.0 \pm 2.0	23.0 \pm 3.0	23.2 \pm 2.9	19.8 \pm 1.7 *
Non-HDL-C (mg/dL)	159.5 \pm 5.8	150.0 \pm 5.8 *	159.4 \pm 6.0	157.3 \pm 6.0

* Significant decrease after the intake of PhyS/ ω 3-milk ($p < 0.05$); Data are given as mean \pm SEM. BMI = body mass index; Ch = cholesterol; HDL = high density lipoproteins; LDL = low density cholesterol; PhyS = phytosterols; TG = triglyceride; VLDL = very-low density lipoproteins.

2.2. Study Phases

The study was subdivided in two phases: (1) A discovery phase where the proteomic profile of the LDL fraction ($N = 5$), HDL fraction ($N = 10$) and lipid-free plasma fraction ($N = 5$) was investigated by bi-dimensional electrophoresis, followed by mass spectrometry (MS) identification (Figure 1b-I) in those subjects that showed the highest response in LDL-C and TG plasma levels after the intervention; and (2) a second phase in which the detected changes were validated by complementary methodologies (reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and ELISA; Figure 1b-II).

Twelve hours fasting blood samples were collected on days 1 and 28 (baseline and endpoint of the first treatment period) and on days 56 and 84 (baseline and endpoint of the second treatment period), as previously described [7]. Blood samples were collected without anticoagulant or in EDTA-containing Vacutainer tubes for serum and plasma preparation, respectively. Serum and plasma fractions were separated by centrifugation at 3000 \times g for 20 min at 4 °C and stored at -80 °C until analysis.

2.3. Sample Preparation

Lipoprotein fractions were prepared in KBr density gradients (1.019–1.063 for LDL and 1.063–1.210 for HDL) [7,22–24]. Lipoprotein purity was routinely analyzed by electrophoresis (2 μ L sample) in agarose gels using a commercial assay (SAS-MX Lipo 10 kit; Helena Biosciences, Gateshead, UK), as described by the providers. In addition, LDL purity was checked by analyzing the LDL profile in samples of randomly selected subjects (one subject per ultracentrifugation batch) by chromatography analysis by microgel filtration using a Superose 6 PC 3.2/30 column and an Agilent 1200 HPLC system,

as previously described. Briefly, 10 μL of undiluted LDL sample fraction were loaded in the system and run with a constant flow of 100 $\mu\text{L}/\text{min}$. The retention time for the LDL fraction (130 min) was compared with that for HDL (134 min). The method of Karlsson et al. [25] was used for LDL protein mapping, with minor modifications as previously described [26]. Briefly, 1 mL of LDLs (1 g/L Apo B) was delipidated by mixing with 14 mL of ice-cold tributylphosphate:acetone:methanol (1:12:1) and incubating for 90 min at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, followed by centrifugation at $2800\times g$ for 15 min. Protein pellets were washed sequentially with 1 mL of tributyl phosphate, acetone, and methanol, and then air dried. Precipitates were boiled in solution containing 0.325 M DTT, 4% chaps, and 0.045 M Tris for 3 min, cooled at room temperature, diluted (1:15) in urea/thiourea/chaps solution, and incubated at $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 15 min. For proteomic studies, HDL samples were prepared as previously described [22–24,26] by precipitation with pure ice-cold acetone and were solubilized in a urea/thiourea buffer (7 M urea, 2 M thiourea, 2% CHAPS).

In order to analyze only the soluble proteins present in plasma, microparticles were removed from LPDP samples by centrifugation at $25,000\times g$ for 45 min at room temperature. For proteomic studies, LPDP was sonicated in ice and filtrated (0.22 μm) by centrifugation to avoid the presence of impurities. The 14 most abundant plasma proteins were depleted by using a specific affinity cartridge as reported by the providers (Multiple Affinity Removal Spin Cartridge, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). LPDP fractions were concentrated and de-salted by centrifugation with 5 kDa cutoff filter devices and sample buffer was exchange to a urea containing buffer (8 M urea, 2% CHAPS). Protein concentration was measured with 2D-Quant Kit (GE Healthcare, Little Chalfont, UK). All processed samples were stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ until use.

2.4. Differential Proteomic Profiling Analysis

2.4.1. Two-Dimensional Gel Electrophoresis (2-DE)

A protein load of 100 μg (analytical gels) and 300 μg (preparative gels) of the urea/thiourea/chaps LDL or HDL extracts or of the urea/chaps LPDP extracts was applied to 17-cm dry strips (pH 4–7 linear range; BioRad, Hercules, CA, USA). The second dimension was resolved in 10–12% SDS-PAGE for LPDP and LDL or HDL samples, respectively. Gels were developed by fluorescent staining (Flamingo; BioRad, Hercules, CA, USA). For each independent experiment, 2-DE for protein extracts from baseline and post-PhyS/ ω 3-milk intake were processed in parallel to guarantee a maximum of comparability. Analysis for differences in protein extracts was performed with the PD-Quest 8.0 (BioRad, Hercules, CA, USA). Each spot was assigned a relative value (AU) that corresponds to the single spot volume compared to the volume of all spots in the gel, following background extraction and normalization between gels, as previously reported [22].

2.4.2. Mass Spectrometry Analysis

Proteins were identified after in-gel tryptic digestion and extraction of peptides from the gel pieces by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) using an AutoFlex III Smart beam MALDI-TOF/TOF (BrukerDaltonics, Billerica, MA, USA), as previously described [23,26]. Samples were applied to Prespotted Anchor Chip plates (BrukerDaltonics, Billerica, MA, USA) surrounding the calibrants provided on the plates. Spectra were acquired with flex control on reflector mode, (mass range: 850–4000 m/z , reflector 1:21.06 kV; reflector 2:9.77 kV; ion source 1 voltage: 19 kV; ion source 2:16.5 kV; detection gain: $2.37\times$) with an average of 3500 added shots at a frequency of 200 Hz. Each sample was processed with FlexAnalysis (version 3.0, BrukerDaltonics, Billerica, MA, USA) considering a signal-to-noise ratio over 3, applying statistical calibration and eliminating background peaks. For identification, peaks between 850 and 1000 m/z were not considered. After processing, spectra were sent to the interface BioTools (version 3.2, BrukerDaltonics, Billerica, MA, USA) and a MASCOT server search on the Swiss-Prot 57.15 database was done (Taxonomy: Homo Sapiens, Mass Tolerance 50 to 100, up to 2 trypsin miss cleavages, Global Modification: Carbamidomethyl (C),

Variable Modification: Oxidation (M)). Identified proteins were accepted when a mascot score higher than 50 was obtained by peptide mass fingerprint and confirmed by peptide fragmentation working in the reflection mode.

2.5. Western Blot Analysis

Protein extracts were resolved by 1-DE under reducing conditions and electrotransferred to nitrocellulose membranes in semi-dry conditions (Trans-Blot Turbo system; BioRad, Hercules, CA, USA). Serum amyloid P (SAP) detection was performed using a mouse monoclonal antibody against total SAP (ab27313, 1:200 dilution, abcam, Cambridge, UK). Band detection was performed using a chemiluminescent substrate dye (Luminata Forte Western HRP Substrate, Merck Millipore, Billerica, MA, USA) and a molecular imager ChemiDoc XRS System, Universal Hood II (BioRad, Hercules, CA, USA). Band quantification was performed with Image Lab 4.0 software (BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA). Protein load was normalized with total protein staining, as previously described [23].

2.6. Quantification of Total Protein Systemic Levels

Total Apo E, Apo A-I, and LCAT levels in the serum samples from the basal condition and after the intake of ω 3-milk were measured by using a commercial sandwich-based ELISA kit in the whole cohort ($N = 32$; Table 1). The detection limit of the assays were: 1.5 ng/mL for Apo E (ELH-Apo E; Human Apo E ELISA Kit; RayBiotech, Norcross, GA, USA); 0.7 μ g/mL for Apo A-I (EA5201-1; Human Apo A-I ELISA Kit; AssayPro, St. Charles, MO, USA); and 0.27 ng/mL for LCAT (RD191122200R; LCAT ELISA Kit; BioVendor, Brno-Řečkovice a Mokr Hora, Czech Republic).

2.7. Gene Expression Analyses

RNA was extracted from total blood samples in a randomly selected group of volunteers using a commercial kit (PreAnalytiX, PAX gene, Quiagen/BD Company, Hilden, Germany) and DNA synthesis was performed using a commercial RT First Strand kit. PAX gene tubes avoid RNA degradation during the transport and storage of blood samples. 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, Waltham, MA, USA) according to the manufacturer's instruction. All expression analyses were normalized with glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH).

2.8. Bioinformatic Analysis

The statistically significant neural network and canonical pathway in which the identified proteins were involved were generated through the use of IPA (Ingenuity System, www.ingenuity.com).

2.8.1. Functional Analysis of a Network

The functional analysis of a network was used to identify the biological functions and/or diseases that were most significant to the molecules in the network. The network molecules associated with biological functions and/or diseases in the Ingenuity Knowledge Base were considered for the analysis. Right-tailed Fisher's exact test was used to calculate a p -value determining the probability that each biological function and/or disease assigned to that network is due to chance alone.

2.8.2. Canonical Pathway Analysis

Canonical pathway analysis was used to identify the pathways from the IPA library that were most significant to the data set. The significance of the association between the data set and the canonical pathway was measured in two ways: (1) a ratio of the number of molecules from the data set that maps to the pathway divided by the total number of molecules that maps to the canonical pathway is displayed; and (2) Fisher's exact test was used to calculate a p -value determining the probability

that the association between the genes in the data set and the canonical pathway is explained by chance alone.

2.9. Statistical Analysis

Data are expressed as mean and standard error unless stated. N indicates the number of subjects tested. Statistical analysis was performed with Stat View 5.0.1 software (SAS Institute, Cary, NC, USA). Differences between the basal condition and after 4 weeks of intake of supplemented milk were tested using repeated measurements ANOVA analysis. A p -value ≤ 0.05 was considered significant.

3. Results

3.1. Four Weeks ω 3-Milk Intake Induces Changes in the Proteomic Profile of the Lipoprotein Plasma Fraction

The intake of Phys-milk did not induce any significant change in the LDL proteome (Supplementary Table S1). Only a trend to increased apolipoprotein A-IV (Apo A-IV) levels was observed ($p = 0.080$). On the contrary, the intake of ω 3-milk (Supplementary Table S2) induced a 1.5-fold significant increase in the Apo E content in LDL ($p = 0.043$; Figure 2a). To analyze if the observed changes in Apo E in the LDL fraction were also found in total serum Apo E levels, a commercial ELISA was run in serum samples of the whole cohort of individuals ($N = 32$). No changes were observed in total Apo E serum levels (Figure 2b). However, a significant increase in Apo E serum levels was observed ($p = 0.015$; Figure 2c) only when individuals ($N = 11$) that showed a reduction in TG plasma levels (30.3% mean decrease) after the intake of ω 3-milk were examined.

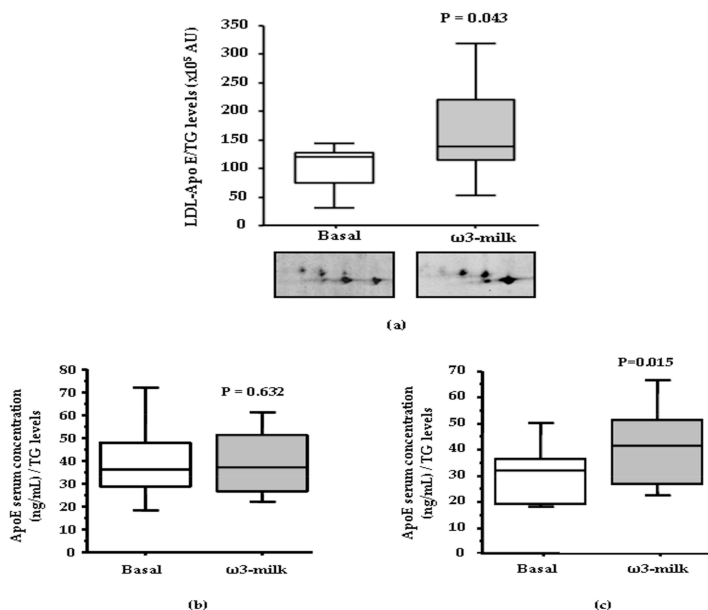


Figure 2. Changes in the apolipoprotein (Apo) E profile. (a) Box-Plot diagram and representative 2-DE images showing the low density lipoprotein (LDL)-associated Apo E proteomic profile before and after the intake of ω 3-milk. A significant increase of Apo E levels ($p = 0.043$) is observed. Box-Plot diagrams showing serum Apo E levels (ng/mL) in basal conditions and after 4-weeks intervention with ω 3-milk, measured by a commercial ELISA. No change was observed when all the volunteers were analyzed ((b); $N = 32$; $p = 0.105$). Apo E concentration of subjects with reduced triglyceride (TG) levels showed a significant increase after ω 3-milk intake ((c); $N = 11$; $p = 0.015$).

The intake of ω 3-milk induced a coordinated increase in the content of several key HDL protein components. Among the observed protein changes, ω 3-milk induced a significant increase of the main HDL protein component, Apo A-I ($p = 0.009$; Figure 3a). Furthermore, there was a coordinated increase of two important enzymes involved in HDL metabolism, LCAT ($p = 0.044$; Figure 3b) and PON-1 ($p = 0.047$; Figure 3c). In addition, ω 3-milk also increased the HDL content of Apo D ($p = 0.008$; Figure 3d) and Apo L1 ($p = 0.038$; Figure 3e). In silicobioinformatic analysis revealed that all the ω 3-milk induced changes in the plasma proteome were related to HDL metabolism-related pathways (Supplementary Figure S1).

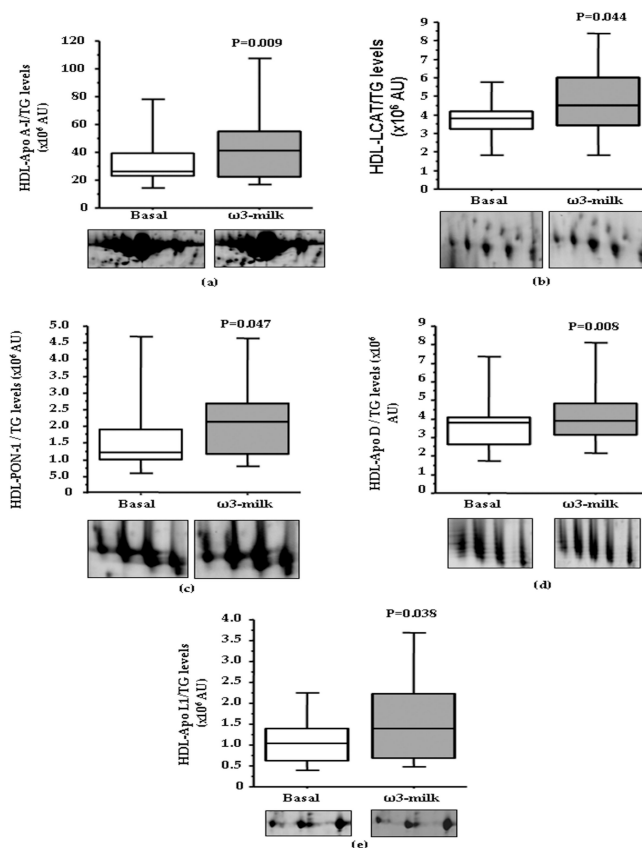


Figure 3. Impact of the intake of ω 3-milk on the high density lipoprotein (HDL) profile. Box-Plots and 2-DE representative images showing the significant changes induced in HDL proteins by ω 3-milk: (a) Apo A-I ($p = 0.009$); (b) lecithin cholesterol acyltransferase (LCAT) ($p = 0.044$); (c) paraoxonase-1 (PON-1) ($p = 0.047$); (d) Apo D ($p = 0.008$); and (e) Apo L1 ($p = 0.038$).

In order to analyze if the observed HDL-associated protein changes were translated into changes in total serum protein levels, Apo A-I and LCAT serum levels were measured with commercial ELISAs in the whole study population. This analysis revealed a lack of differences in both Apo A-I and LCAT (Figure 4a) total serum levels after ω 3-milk intake when compared to basal levels. However, and as observed with Apo E, if only those subjects with a reduction on TG levels were analyzed, a non-significant trend to increased Apo A-I levels ($p = 0.099$) and a significant increase in LCAT levels ($p = 0.0397$; Figure 4b) after the intake of ω 3-milk was observed. These results highlight that

the changes observed on the lipid-associated plasma protein fraction after the intake of ω 3-milk are associated to the changes on the HDL proteomic profile.

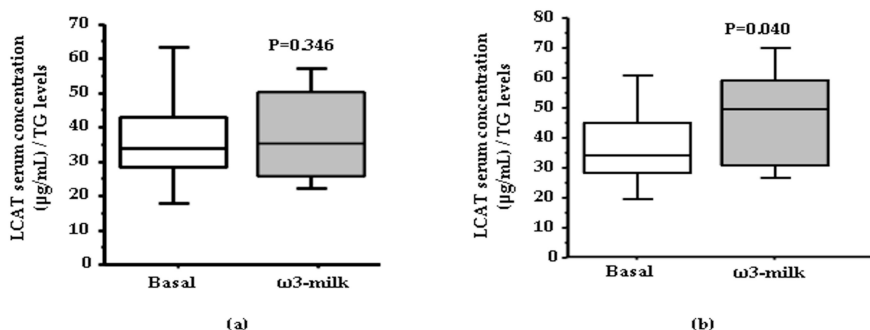


Figure 4. Changes on lecithin cholesterol acyltransferase (LCAT) serum levels after ω 3-milk intake. Box-Plot diagrams showing LCAT concentration ($\mu\text{g}/\text{mL}$) in basal conditions and after the intake of ω 3-milk, measured by a commercial ELISA. (a) No change was observed when all the volunteers were analyzed ($N = 32$; $p = 0.346$). (b) There was a significant increase in LCAT serum levels in subjects that showed a reduction in TG levels after ω 3-milk intake ($N = 11$; $p = 0.0397$).

3.2. Inflammation Associated Changes after PhyS-Milk Intake

Proteomic analysis of the lipoprotein-depleted-plasma (LPDP) fraction revealed that the intake of PhyS-milk induced a non-significant decreasing trend in the levels of the pro-inflammatory protein SAP when compared to the basal samples ($p = 0.075$; Figure 5a; Supplementary Table S3). This result was confirmed after Western blot (WB) validation where a 1.21-mean fold decrease in SAP levels was detected in LPDP samples after the intake of PhyS-milk ($p = 0.001$; Figure 5b).

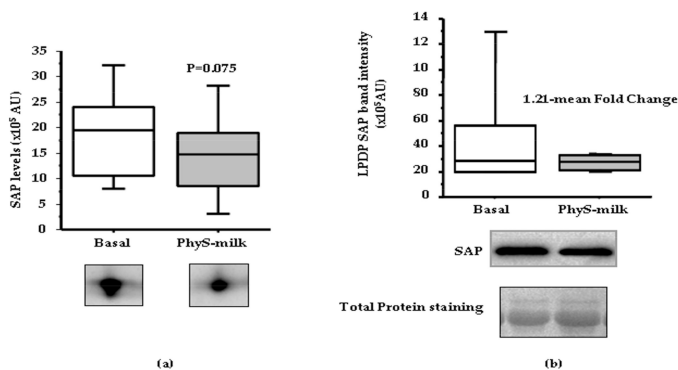


Figure 5. Serum amyloid P (SAP) proteomic profile. (a) Box-Plot diagram and 2-DE representative image showing a SAP decreasing trend in the soluble protein fraction of plasma (LPDP) proteomic profile after the intake of PhyS-milk ($p = 0.075$); (b) Box-Plot and representative western blot image showing changes in SAP in the LPDP samples after PhyS-milk intake ($N = 5$; 1.21-Fold change; $p = 0.001$).

On the contrary, no changes were observed in the LPDP fraction after the intake of ω 3-milk (Supplementary Table S4).

Due to the observed changes in the inflammation-associated pentraxin SAP after the intake of PhyS-milk, we investigated if PhyS-milk could induce changes in the expression of the key pro-inflammatory chemokine in inflammatory cells, C-C motif chemokine 2 (CCL2). This analysis revealed a significant reduction of the CCL2 transcripts after the intake of PhyS-milk ($p = 0.03$; Figure 6). In addition, a trend towards increased expression levels of the Interleukin 10 receptor (IL-10R; $p = 0.06$) was also observed.

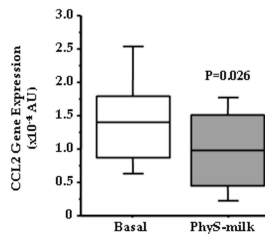


Figure 6. C-C motif chemokine 2 (CCL2) gene expression. Box-plot diagram showing the significant decrease in CCL2 gene expression after the intake of PhyS-milk in the peripheral blood leukocyte fraction of a randomly selected group of subjects ($N = 12$; $p = 0.026$).

4. Discussion

Nutritional intervention is a useful strategy for the prevention of many diseases, especially in those in which obesity is a risk factor [27]. Phytosterols (PhyS) are natural components derived from plants and vegetable oils with a similar structure to cholesterol that are not synthesized in humans [28]. Through their ability to interfere with cholesterol metabolism, PhyS have been shown to effectively reduce cholesterol levels, and possibly beneficially affect CVD risk prevention [29].

Our group and others have demonstrated that the intake of plant stanols and sterols, in different food-platforms, reduces serum levels of total cholesterol. However, controversy exists regarding plant sterols-mediated protection as some studies have suggested a potential deleterious effect in relation to cardiovascular risk [30–32]. The explanation of these contradictory results seems to be related to the amount of stanol supplementation. In fact, it has been shown that the increase in stanol supplementation beyond the maximum recommendable dose of 3 mg/day is not associated with a higher reduction of cholesterol levels [33]. Importantly, in our study, an intake of 1.6 g PhyS/day (value within the recommended dose range) with low fat milk for four weeks reduced total cholesterol, non-HDL-C, and LDL-C, and also reduced the susceptibility of LDL to oxidation [7]. It is important to highlight, that in the present study, each patient is his/her own control as all the analyzed variables have been compared to the baseline levels measured in each subject after a wash-out run-in period with plain low-fat milk. Indeed, the aim of the clinical trial was to compare the effects of both PhyS- and ω 3-milk interventions. Although we cannot exclude a potential effect inherent to the participation in the study, the two-arm crossover design with the two bioactive products minimizes the potential influence of this effect in the results.

Here, we have observed a significant decrease in the pro-inflammatory pentraxin SAP in the soluble fraction of plasma (LPDP) of the healthy-overweight volunteers after the intake for four weeks of PhyS-milk. SAP plays an important role in innate immunity and in the atherosclerotic process [34]. Pentraxins have been detected within advanced human atherosclerotic plaques suggested to play an active role in atherogenesis [35]. Indeed, we have previously demonstrated an important increase in SAP levels in the early phase post acute myocardial infarction (AMI), and an even higher increase of this protein 3 days after the event [36]. SAP deficiency prevents atherosclerosis [37] and it is involved in other key biological processes for the cardiovascular system, such as inflammation, fibrosis, and coagulation [34,38]. Specifically, pentraxins have been shown to contribute to the chronic

low-grade inflammatory state that characterizes obesity [39]. Therefore, the intake of PhyS-milk can reduce the cardiovascular risk associated to overweight and obesity by reducing the pro-inflammatory protein SAP.

Moreover, we have also found a significant decrease in the expression of the gene encoding for C-C motif chemokine 2 (CCL2), also known as monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), and a trend to decreased the IL10-R, two important cytokines with pro- and anti-inflammatory properties respectively involved in CVD, after dietary intervention with PhyS-milk. In fact, it was shown that the intake of PhyS produces an anti-inflammatory reaction by acting on cytokines' activity [40]. CCL2/MCP-1 is a key driver of adipose tissue inflammation in obesity [41]. Indeed, it is directly implicated in the propagation of the chronic low-grade inflammatory state associated to obesity [42–44] through its role as a monocyte attractant, which is the major cell that differentiates into macrophages and foam cells in the atherosclerotic lesion [40]. On the other hand, IL-10 is an anti-inflammatory protein by suppressing the synthesis of pro-inflammatory cytokines and also by inhibiting the activation of macrophages [45]. Therefore, our results highlight that PhyS-milk consumption may induce a shift towards a decreased inflammatory state through its effect on two key cytokines, CCL2/MCP-1 and IL-10, having thus a potential effect in the context of obesity where inflammatory pathways are exacerbated.

The cardiovascular benefits of fish oils are well known and directly attributed to the effects of ω 3 fatty acids (FA) [46]. Beneficial effects of ω 3 and ω 6 FA have been compared and the results suggest that higher levels of ω 3 FA are protective against atherosclerosis. Therefore, modern western diets are directed towards a reduction of the ω 6/ ω 3 FA ratio to protect against atherosclerosis [47,48]. Previous studies of our group have shown that the ingestion of this ω 3-milk reduces the levels of triglycerides (TG) and palmitic acid [7]. Palmitic acid is a major component of the western diet and is associated with insulin resistance and glucose intolerance, becoming an important risk factor of diabetes and CVD [49]. Importantly, these metabolic alterations are often present in obese individuals. Our proteomic approach has shown that regular intake of ω 3-milk results in a significant increase of Apo E protein level in LDL. It had been suggested that ω 3 FA effects in reducing TG levels are dependent on Apo E [47]. Indeed, the beneficial effects of ω 3 FA are partially blunted in Apo E deficient (Apo E^{-/-}) mice, suggesting that Apo E is necessary for the cardioprotective effects exerted by ω 3 [50]. Accordingly, diverse studies have shown that Apo E^{-/-} mice suffer hypercholesterolemia and an association between Apo E levels and CVD has also been reported in humans [51,52]. Even more, it has been shown that in the absence of some isoforms of Apo E, the beneficial cardioprotective effect of ω 3 PUFA may be partially lost [53,54]. Of note, our results highlight an association between Apo E increase in LDL and an improved TG profile in obese subjects after four weeks intervention with ω 3-milk.

Importantly, herein we describe for the first time that the intake of ω 3-milk induces a coordinated increase of several HDL associated proteins. Diverse studies show that the antioxidant effect of HDL is associated to a coordinated action of different proteins that allow HDL to protect LDL from oxidation for a longer period [18,55]. This correlates with the importance of HDL composition, emphasizing on HDL quality rather than HDL quantity. Apo A-I is the major protein component of HDL and therefore the cardioprotective benefits of HDL are often associated to this protein. High levels of Apo A-I are associated to a reduced vascular lesion and to an increase in the HDL plasma level [56]. It is widely known that Apo A-I is implicated on cholesterol transport from peripheral tissues to the liver for its clearance by the formation and stabilization of the HDL, but many additional proteins are also implicated in this process [9]. Lipid-free Apo A-I produces the nascent HDL particles and LCAT catalyzes HDL maturation by the esterification of free cholesterol (FC) into cholesteryl esters (CE), being both particles accumulated into the core of the HDL particle. Then, cholesterol ester transfer protein (CEPT) transfer CE particles for the mature form of HDL (HDL2) to VLDL and LDL to be finally excreted and eliminated [57,58]. LCAT is essential for cholesterol esterification, but also needs the presence of other proteins to be activated. Thus, Apo A-I and Apo E are the best LCAT activators in plasma and PON-1 protects LCAT from its inactivation [58]. PON-1 appears predominantly associated

to HDL, especially to HDL3 and it is activated and stabilized by Apo A-I. PON-1 is an atheroprotective protein with an important role as an anti-oxidant [57]. Interestingly, in the present study we have found that ω 3-milk intake significantly increases the HDL content of key proteins involved in HDL metabolism such as Apo A-I and LCAT. Those changes are specifically associated to a reduction in TG plasma levels after the intake of ω 3-milk. Thus, it is conceivable that ω 3 by increasing Apo A-I and LCAT levels enhances both cholesterol esterification and transport, significantly improving the lipoprotein profile (Figure 7). Furthermore, the ω 3-milk-induced increase observed in PON1 could not only enhance LCAT activity but could also improve the anti-oxidant abilities of HDL particles. In addition, we observed an increase in Apo D HDL levels after the intake of ω 3-milk. Apo D has been implicated in the reduction of TG plasma levels and also binds to LCAT improving its esterification activity [59]. Thus, the increase observed in Apo D after ω 3-milk intake could contribute not only to the reduction in TG plasma levels but also to a decrease in VLDL-C levels (Figure 7). Furthermore, our study has shown that ω 3-milk intake increases Apo L1 HDL content in overweight subjects. Apo L1 is mainly studied in chronic kidney disease, but studies in our group showed that a coordinated decrease in HDL content of both LCAT and Apo L1 seem to predispose to the presentation of acute ischemic events in hypercholesterolemia patients [24]. Therefore, the coordinated increase in both HDL-associated proteins after ω 3-milk intake could reduce the CVD risk in high risk subjects such as those with overweight and metabolic syndrome.

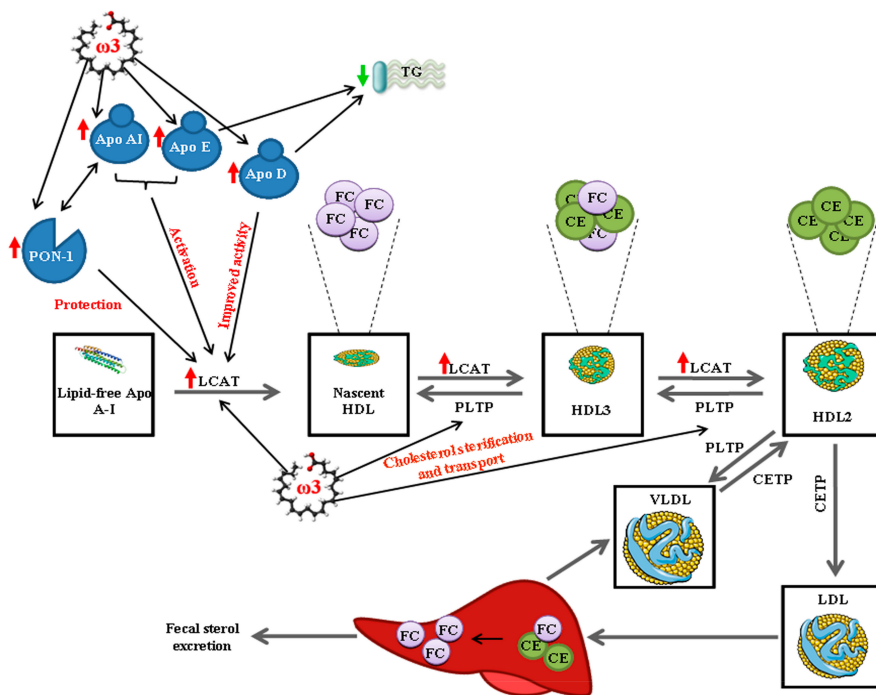


Figure 7. Simplified diagram of the lipid metabolism canonical pathway. Maturation of HDL and free cholesterol (FC) esterification are catalyzed by LCAT. Apo A-I and Apo E activate LCAT, and PON-I, which is also activated by Apo A-I, avoiding LCAT inactivation. Apo D binds to LCAT to improve its esterification activity. Finally, cholesterol is transported to the liver for its elimination by fecal excretion.

5. Conclusions

In summary, our study supports the concept of supplementing diets with ω 3 FA and PhyS to prevent CVD by inducing a coordinated change of the lipid-associated plasma protein fraction profile and by reducing inflammation. These changes are then translated into a significant improvement of the lipid profile. This is of great importance in obese subjects, since they are more predisposed to suffer metabolic alterations and therefore increased risk of CVD. A healthy lifestyle and appropriate nutrition are key factors in the prevention of CVD, and the results of the present study support the notion that diet supplementation with PhyS and ω 3 FA has beneficial effects against CVD in overweight and obese individuals by acting on two hallmarks of CVD progression, inflammation, and lipid metabolism.

Supplementary Materials: The following are available online at www.mdpi.com/2072-6643/9/6/599/s1, Figure S1: In silico analysis of HDL protein changes, Table S1: Lipid and inflammation proteins, Table S2: Lipid and inflammation proteins, Table S3: Protein composition in lipoprotein depleted plasma after PhyS-milk intake, Table S4: Protein composition in lipoprotein depleted plasma after ω 3-milk intake.

Acknowledgments: The technical assistance of María Dolores Fernández and Ona Catot is gratefully acknowledged. Authors are indebted with Dra. Sandra Camino for the genomic support, and with María José Bartolomé and Montse Gómez-Pardo for their contribution during the clinical study. Finally, authors thank the study participants for their valuable contribution and CAPSA Food S.A., especially Marta Hernández, for providing the milk products used in the study. This work was supported by grants from CDTI Spanish Ministry of Competitiveness and Economy (MINECO) (CEN-20101016 (HENUFOOD) to L.B.); the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness of Science (SAF2016-76819-R to L.B.); Institute of Health Carlos III, ISCIII (TERCEL RD16/00110018; and CB16/11/0041 to L.B.; and FIS PI16/01915 to T.P.); FEDER “UnaManera de Hacer Europa”; the Secretary of University and Research, Department of Economy and Knowledge of the Government of Catalonia (2014SGR1303 to L.B.); and “CERCA Programme/Generalitat de Catalunya” Spain. We thank FIC-FundacionJesús Serra, Barcelona, Spain, for their continuous support.

Author Contributions: C.L. designed and conducted the research; analyzed data and performed the statistical analysis; and wrote the manuscript. J.C. designed and conducted the research; analyzed data and performed the statistical analysis; and wrote the manuscript. T.P. designed and supervised the research; analyzed data and performed the statistical analysis; and wrote the manuscript. J.S.H. designed the research; provided essential reagents or provided essential materials; and analyzed data. R.M.A. designed the research; provided essential reagents or provided essential materials; and analyzed data. A.P. designed the research; provided essential reagents or provided essential materials; and analyzed data. L.B. designed and supervised the research; analyzed data and performed the statistical analysis; and wrote and revised the manuscript. All authors had primary responsibility for the final content and approved the final version of the manuscript.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Bastien, M.; Poirier, P.; Lemieux, I.; Despres, J.P. Overview of epidemiology and contribution of obesity to cardiovascular disease. *Prog. Cardiovasc. Dis.* **2014**, *56*, 369–381. [CrossRef] [PubMed]
- Sayon-Orea, C.; Carlos, S.; Martínez-Gonzalez, M.A. Does cooking with vegetable oils increase the risk of chronic diseases: A systematic review. *Br. J. Nutr.* **2015**, *113*, S36–S48. [CrossRef] [PubMed]
- Stefler, D.; Malyutina, S.; Kubinova, R.; Pajak, A.; Peasey, A.; Pikhart, H.; Brunner, E.J.; Bobak, M. Mediterranean diet score and total and cardiovascular mortality in Eastern Europe: The HAPIEE study. *Eur. J. Nutr.* **2015**, *56*, 1–9. [CrossRef] [PubMed]
- Badimon, L.; Vilahur, G.; Padro, T. Nutraceuticals and atherosclerosis: Human trials. *Cardiovasc. Ther.* **2010**, *28*, 202–215. [CrossRef] [PubMed]
- Ignarro, L.J.; Balestrieri, M.L.; Napoli, C. Nutrition, physical activity, and cardiovascular disease: An update. *Cardiovasc. Res.* **2007**, *73*, 326–340. [CrossRef] [PubMed]
- Psota, T.L.; Gebauer, S.K.; Kris-Etherton, P. Dietary omega-3 fatty acid intake and cardiovascular risk. *Am. J. Cardiol.* **2006**, *98*, 3i–18i. [CrossRef] [PubMed]
- Padro, T.; Vilahur, G.; Sanchez-Hernandez, J.; Hernandez, M.; Antonijoan, R.M.; Perez, A.; Badimon, L. Lipidomic changes of LDL in overweight and moderately hypercholesterolemic subjects taking phytosterol- and omega-3-supplemented milk. *J. Lipid Res.* **2015**, *56*, 1043–1056. [CrossRef] [PubMed]

8. Racette, S.B.; Lin, X.; Lefevre, M.; Spearie, C.A.; Most, M.M.; Ma, L.; Ostlund, R.E. Dose effects of dietary phytosterols on cholesterol metabolism: A controlled feeding study. *Am. J. Clin. Nutr.* **2010**, *91*, 32–38. [CrossRef] [PubMed]
9. Badimon, L.; Vilahur, G. LDL-cholesterol versus HDL-cholesterol in the atherosclerotic plaque: Inflammatory resolution versus thrombotic chaos. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2012**, *1254*, 18–32. [CrossRef] [PubMed]
10. Vilahur, G.; Gutiérrez, M.; Casaní, L.; Cubedo, J.; Capdevila, A.; Pons-Llado, G.; Carreras, F.; Hidalgo, A.; Badimon, L. Hypercholesterolemia Abolishes High-Density Lipoprotein-Related Cardioprotective Effects in the Setting of Myocardial Infarction. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2015**, *66*, 2469–2470. [CrossRef] [PubMed]
11. Schaefer, E.J.; Anthonot, P.; Asztalos, B.F. High-density lipoprotein metabolism, composition, function, and deficiency. *Curr. Opin. Lipidol.* **2014**, *25*, 194–199. [CrossRef] [PubMed]
12. Badimon, L.; Vilahur, G.; Cubedo, J. High density lipoproteins and kidney function: The friend turned foe? *J. Thorac. Dis.* **2016**, *8*, 2978–2981. [CrossRef] [PubMed]
13. Badimon, L.; Vilahur, G. HDL particles—More complex than we thought. *Thromb. Haemost.* **2014**, *112*, 857. [CrossRef] [PubMed]
14. Gao, F.; Ren, Y.; Shen, X.; Bian, Y.; Xiao, C.; Li, H. Correlation between the High Density Lipoprotein and its Subtypes in Coronary Heart Disease. *Cell. Physiol. Biochem.* **2016**, *38*, 1906–1914. [CrossRef] [PubMed]
15. Navab, M. Thematic review series: The Pathogenesis of Atherosclerosis: The oxidation hypothesis of atherogenesis: The role of oxidized phospholipids and HDL. *J. Lipid Res.* **2004**, *45*, 993–1007. [CrossRef] [PubMed]
16. Huang, N.F.; Kurpinski, K.; Fang, Q.; Lee, R.J.; Li, S. Proteomic identification of biomarkers of vascular injury. *Am. J. Transl. Res.* **2011**, *3*, 139–148. [PubMed]
17. Kassai, A.; Illyés, L.; Mirdamadi, H.Z.; Seres, I.; Kalmár, T.; Audikovszky, M.; Paragh, G. The effect of atorvastatin therapy on lecithin:cholesterol acyltransferase, cholesteryl ester transfer protein and the antioxidant paraoxonase. *Clin. Biochem.* **2007**, *40*, 1–5. [CrossRef] [PubMed]
18. Hine, D.; MacKness, B.; MacKness, M. Coincubation of PON1, APO A1, and LCAT increases the time HDL is able to prevent LDL oxidation. *IUBMB Life* **2012**, *64*, 157–161. [CrossRef] [PubMed]
19. Daigo, K.; Inforzato, A.; Barajon, I.; Garlanda, C.; Bottazzi, B.; Meri, S.; Mantovani, A. Pentraxins in the activation and regulation of innate immunity. *Immunol. Rev.* **2016**, *274*, 202–217. [CrossRef] [PubMed]
20. Du Clos, T.W. Pentraxins: Structure, function, and role in inflammation. *ISRN Inflamm.* **2013**, *2013*, 379040. [CrossRef] [PubMed]
21. Vilahur, G.; Badimon, L. Biological actions of pentraxins. *Vascul. Pharmacol.* **2015**, *73*, 38–44. [CrossRef] [PubMed]
22. Cubedo, J.; Padró, T.; García-Arguinzonis, M.; Vilahur, G.; Miñambres, I.; Pou, J.M.; Ybarra, J.; Badimon, L. A novel truncated form of apolipoprotein A-I transported by dense LDL is increased in diabetic patients. *J. Lipid Res.* **2015**, *56*, 1762–1773. [CrossRef] [PubMed]
23. Cubedo, J.; Padró, T.; Badimon, L. Glycoproteome of human apolipoprotein A-I: N- and O-glycosylated forms are increased in patients with acute myocardial infarction. *Transl. Res.* **2014**, *164*, 209–222. [CrossRef] [PubMed]
24. Cubedo, J.; Padró, T.; Alonso, R.; Mata, P.; Badimon, L. Apo L1 levels in HDL and cardiovascular event presentation in patients with familial hypercholesterolemia. *J. Lipid Res.* **2016**, *57*, 1059–1073. [CrossRef] [PubMed]
25. Karlsson, H.; Leanderson, P.; Tagesson, C.; Lindahl, M. Lipoproteomics I: Mapping of proteins in low-density lipoprotein using two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Proteomics* **2005**, *5*, 551–565. [CrossRef] [PubMed]
26. Cubedo, J.; Padró, T.; García-Moll, X.; Pintó, X.; Cinca, J.; Badimon, L. Proteomic signature of apolipoprotein J in the early phase of new-onset myocardial infarction. *J. Proteom. Res.* **2011**, *10*, 211–220. [CrossRef] [PubMed]
27. Juni, M.H. OBESITY: A Public Health Threats in Developing Countries. *Int. J. Public Health Clin. Sci.* **2015**, *2*, 2289–7577.
28. Richard, E.; Ostlund, J. Phytosterols in Human Nutrition. *Annu. Rev. Nutr.* **2002**, *22*, 533–549. [CrossRef] [PubMed]

29. Intake, P.; Meijer, L.; Zock, P.L.; Geleijnse, J.M.; Trautwein, E.A. Continuous Dose-Response Relationship of the LDL-Cholesterol—Lowering Effect of Phytosterol Intake. *J. Nutr.* **2009**, *139*, 271–284. [CrossRef] [PubMed]
30. Glueck, C.J.; Speirs, J.; Tracy, T.; Streicher, P.; Illig, E.; Vandegrift, J. Relationships of serum plant sterols (phytosterols) and cholesterol in 595 hypercholesterolemic subjects, and familial aggregation of phytosterols, cholesterol, and premature coronary heart disease in hyperphytosterolemic probands and their first-degree relatives. *Metabolism* **1991**, *40*, 842–848. [PubMed]
31. Assmann, G.; Cullen, P.; Erbey, J.; Ramey, D.R.; Kannenberg, F.; Schulte, H. Plasma sitosterol elevations are associated with an increased incidence of coronary events in men: Results of a nested case-control analysis of the Prospective Cardiovascular Munster (PROCAM) study. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* **2006**, *16*, 13–21. [CrossRef] [PubMed]
32. Sudhop, T.; Gottwald, B.M.; von Bergmann, K. Serum plant sterols as a potential risk factor for coronary heart disease. *Metabolism* **2002**, *51*, 1519–1521. [CrossRef] [PubMed]
33. Weingärtner, O.; Böhm, M.; Laufs, U. Controversial role of plant sterol esters in the management of hypercholesterolaemia. *Eur. Heart J.* **2009**, *30*, 404–409. [CrossRef] [PubMed]
34. Bottazzi, B.; Inforzato, A.; Messa, M.; Barbagallo, M.; Magrini, E.; Garlanda, C.; Mantovani, A. The pentraxins PTX3 and SAP in innate immunity, regulation of inflammation and tissue remodelling. *J. Hepatol.* **2016**, *64*, 1–12. [CrossRef] [PubMed]
35. Li, X.A.; Hatanaka, K.; Ishibashi-Ueda, H.; Yutani, C.; Yamamoto, A. Characterization of Serum Amyloid P Component From Human Aortic Atherosclerotic Lesions. *Arter. Thromb. Vasc. Biol.* **1995**, *15*, 252–257. [CrossRef]
36. Cubedo, J.; Padró, T.; Badimon, L. Coordinated proteomic signature changes in immune response and complement proteins in acute myocardial infarction: The implication of serum amyloid P-component. *Int. J. Cardiol.* **2013**, *168*, 5196–5204. [CrossRef] [PubMed]
37. Zheng, L.; Wu, T.; Zeng, C.; Li, X.; Li, X.; Wen, D.; Ji, T.; Lan, T.; Xing, L.; Li, J.; et al. SAP deficiency mitigated atherosclerotic lesions in ApoE^{-/-} mice. *Atherosclerosis* **2016**, *244*, 179–187. [CrossRef] [PubMed]
38. Xi, D.; Luo, T.; Xiong, H.; Liu, J.; Lu, H.; Li, M.; Hou, Y.; Guo, Z. SAP: Structure, function, and its roles in immune-related diseases. *Int. J. Cardiol.* **2015**, *187*, 20–26. [CrossRef] [PubMed]
39. Ogawa, T.; Kawano, Y.; Imamura, T.; Kawakita, K.; Sagara, M.; Matsuo, T.; Kakitsubata, Y.; Ishikawa, T.; Kitamura, K.; Hatakeyama, K.; et al. Reciprocal Contribution of Pentraxin 3 and C-Reactive Protein to Obesity and Metabolic Syndrome. *Obesity* **2010**, *18*, 1871–1874. [CrossRef] [PubMed]
40. Kanda, H.; Tateya, S.; Tamori, Y.; Kotani, K.; Hiasa, K.; Kitazawa, R.; Kitazawa, S.; Miyachi, H.; Maeda, S.; Egashira, K.; et al. MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. *J. Clin. Investig.* **2006**, *116*, 1494–1505. [CrossRef] [PubMed]
41. Panee, J. Monocyte Chemoattractant Protein 1 (MCP-1) in obesity and diabetes. *Cytokine* **2012**, *60*, 1–12. [CrossRef] [PubMed]
42. Badimon, L.; Cubedo, J. Adipose tissue depots and inflammation: Effects on plasticity and resident mesenchymal stem cell function. *Cardiovasc. Res.* **2017**. [CrossRef] [PubMed]
43. Wensveen, F.M.; Valentić, S.; Šestan, M.; Turk Wensveen, T.; Polić, B. The “Big Bang” in obese fat: Events initiating obesity-induced adipose tissue inflammation. *Eur. J. Immunol.* **2015**, *45*, 2446–2456. [CrossRef] [PubMed]
44. Han, M.S.; Jung, D.Y.; Morel, C.; Lakhani, S.A.; Kim, J.K.; Flavell, R.A.; Davis, R.J. JNK Expression by Macrophages Promotes Obesity-induced Insulin Resistance and Inflammation. *Science* **2013**, *339*, 1089–1098. [CrossRef] [PubMed]
45. Moore, K.W.; De Waal Malefyt, R.; Coffman, R.L.; O’garra, A. Interleukin-10 and the Interleukin-10 receptor. *Annu. Rev. Immunol.* **2001**, *19*, 683–765. [CrossRef] [PubMed]
46. Liang, S.; Steffen, L.M.; Steffen, B.T.; Guan, W.; Weir, N.L.; Rich, S.S.; Manichaikul, A.; Vargas, J.D.; Tsai, M.Y. APOE genotype modifies the association between plasma omega-3 fatty acids and plasma lipids in the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). *Atherosclerosis* **2013**, *228*, 181–187. [CrossRef] [PubMed]
47. Wan, J.B.; Huang, L.L.; Rong, R.; Tan, R.; Wang, J.; Kang, J.X. Endogenously decreasing tissue n-6/n-3 fatty acid ratio reduces atherosclerotic lesions in apolipoprotein E-deficient mice by inhibiting systemic and vascular inflammation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2010**, *30*, 2487–2494. [CrossRef] [PubMed]

48. Simopoulos, A.P. An increase in the Omega-6/Omega-3 fatty acid ratio increases the risk for obesity. *Nutrients* **2016**, *8*, 128. [CrossRef] [PubMed]
49. Snook, J.T.; Park, S.; Williams, G.; Tsai, Y.-H.; Lee, N. Effect of synthetic triglycerides of myristic, palmitic, and stearic acid on serum lipoprotein metabolism. *Eur. J. Clin. Nutr.* **1999**, *53*, 597–605. [CrossRef] [PubMed]
50. Brown, A.L.; Zhu, X.; Rong, S.; Shewale, S.; Seo, J.; Boudyguina, E.; Gebre, A.K.; Alexander-Miller, M.A.; Parks, J.S. Omega-3 fatty acids ameliorate atherosclerosis by favorably altering monocyte subsets and limiting monocyte recruitment to aortic lesions. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2012**, *32*, 2122–2130. [CrossRef] [PubMed]
51. Conway, V.; Allard, M.; Minihane, A.; Jackson, K.G.; Lovegrove, J.A.; Plourde, M. Postprandial enrichment of triacylglycerol-rich lipoproteins with omega-3 fatty acids: Lack of an interaction with apolipoprotein E genotype? *Lipids Health Dis.* **2014**, *13*, 148. [CrossRef] [PubMed]
52. Reilly, M.; Rader, D.J. Apolipoprotein E and coronary disease: A puzzling paradox. *PLoS Med.* **2006**, *3*, 736–738. [CrossRef] [PubMed]
53. Chouinard-watkins, R.; Plourde, M. Fatty Acid Metabolism in Carriers of Apolipoprotein E Epsilon 4 Allele: Is It Contributing to Higher Risk of Cognitive Decline and Coronary Heart Disease? *Nutrients* **2014**, *6*, 4452–4471. [CrossRef] [PubMed]
54. Kaneva, A.M.; Bojko, E.R.; Potolitsyna, N.N.; Odland, J.O. Plasma levels of apolipoprotein-E in residents of the European North of Russia. *Lipids Health Dis.* **2013**, *12*, 43. [CrossRef] [PubMed]
55. Daniels, J.-A.; Mulligan, C.; McCance, D.; Woodside, J.V.; Patterson, C.; Young, I.S.; McEneny, J. A randomised controlled trial of increasing fruit and vegetable intake and how this influences the carotenoid concentration and activities of PON-1 and LCAT in HDL from subjects with type 2 diabetes. *Cardiovasc. Diabetol.* **2014**, *13*, 16. [CrossRef] [PubMed]
56. White, C.R.; Garber, D.W.; Anantharamaiah, G.M. Anti-inflammatory and cholesterol-reducing properties of apolipoprotein mimetics: A review. *J. Lipid Res.* **2014**, *55*, 2007–2021. [CrossRef] [PubMed]
57. Gugliucci, A.; Menini, T. Paraoxonase 1 and HDL maturation. *Clin. Chim. Acta* **2015**, *439*, 5–13. [CrossRef] [PubMed]
58. Rousset, X.; Vaisman, B.; Amar, M.; Sethi, A.A.; Remaley, A.T. Lecithin: cholesterol acyltransferase: From biochemistry to role in cardiovascular disease. *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes.* **2009**, *16*, 163–171. [CrossRef] [PubMed]
59. Ali, K.; Abo-Ali, E.M.; Kabir, M.D.; Riggins, B.; Nguy, S.; Li, L.; Srivastava, U.; Thinn, S.M.M. A Western-fed diet increases plasma HDL and LDL-cholesterol levels in ApoD^{-/-} mice. *PLoS ONE* **2014**, *9*, 1–16. [CrossRef] [PubMed]



© 2017 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

RESULTADOS

Material suplementario.

Supplemental Table S1. Lipid and inflammation proteins. Average protein composition after 4-weeks intervention with low-fat milk supplemented with Phytosterols

	Protein	Basal*	PhyS*	PhyS/B	P-value
LDL	Apo A-I	30.5	26.7	0.79	0.22
	Apo A-IV	1.4	1.9	1.64	0.08
	Apo CIII	6	3.7	0.43	0.18
	Apo D	8.1	4.4	0.60	0.14
	Apo E	23.5	25.6	0.96	0.89
	Apo J	2.2	2.4	0.92	0.50
	Apo L1	0.7	0.7	1.30	0.22
	HDL	AAT	2.46	2.4616	1.00
Apo D		8.80	9.11	1.04	0.55
Apo L1		3.17	2.69	0.85	0.13
Apo M		1.47	1.79	1.21	0.12
Apo AIV		1.39	1.34	0.96	0.59
Apo AI		1038.53	799	0.77	0.46
Apo E		6.24	6.05	0.97	0.72
C3 Complement		0.07	0.07	0.92	0.69
Fibrinogen gamma chain		0.02	0.02	0.93	0.50
HPT		0.26	0.26	0.99	0.95
LCAT		0.81	0.94	1.17	0.22
PON-1		3.80	3.52	0.92	0.18
Serum albumin		7.56	8.01	1.06	0.64
Serum Amyloid A-4		0.28	0.39	1.39	0.08
TTR		0.20	0.25	1.20	0.12

* Protein intensity corrected by total-cholesterol levels, expressed as mean value of all subjects $\times 10^5$ AU

AAT=alpha-1 antitrypsin; Apo=apolipoprotein; HDL=high density lipoproteins; HPT=haptoglobin; LCAT=lecitin cholesterol acyltransferase; LDL=low density lipoproteins; PhyS=phytosterols; PON-1=paraoxonase-1; TTR=transthyretin.

Supplemental Table S2. Lipid and inflammation proteins. Average protein composition after 4-weeks intervention with low-fat milk supplemented with Omega 3

	Protein	Basal*	$\omega 3^*$	$\omega 3/B$	P-value
LDL	Apo A-I	105.4	170.5	1.8	0.50
	Apo A-IV	7.3	5.9	0.83	0.23
	Apo CIII	44.1	29.2	0.63	-
	Apo D	20.7	35.3	1.3	0.14

HDL	Apo E	120.8	138.9	1.5	0.04
	Apo J	11.9	21.5	1.7	0.14
	Apo L1	2.7	2.8	1.00	0.89
	AAT	12.19	17.64	1.45	0.13
	Apo D	40.07	45.29	1.13	0.008
	Apo L1	11.30	16.54	1.46	0.04
	Apo M	6.99	7.58	1.08	0.23
	Apo AIV	7.29	8.22	1.13	0.22
	Apo AI	3577.60	4733.38	1.32	0.009
	Apo E	32.48	42.26	1.30	0.22
	C3 Complement	0.35	1.03	2.95	0.25
	Fibrinogen gamma chain	1.30	2.12	1.63	0.28
	HPT	3.79	4.79	1.26	0.15
	LCAT	19.24	22.40	1.16	0.04
	PON-1	35.23	49.10	1.39	0.05
	Serumalbumin	2.58	1.39	0.54	0.24
	SerumAmyloid A-4	0.98	1.56	1.60	0.24
	TTR	0.07	0.47	6.35	0.11

* Protein intensity corrected by triglyceride levels, expressed as mean value of all subjects x10⁵ AU

AAT=alpha-1 antitrypsin; Apo=apolipoprotein; HDL=high density lipoproteins; HPT=haptoglobin; LCAT=lecitin cholesterol acyltransferase; LDL=low density lipoproteins; PON-1=paraoxonase-1; TTR=transthyretin.

Supplemental Table S3. Protein composition in lipoprotein depleted plasma after PhyS-milk intake.

Protname	Basal*	PhyS*	PhyS/B	P Value
Alpha-1-antitripsin	5.47	14.57	2.66	0.18
Alpha-1B-glycoprotein	260.46	233.79	1.11	0.47
Alpha-2-antiplasmin	40.03	33.43	0.83	0.14
Apo A-I	2.81	9.18	3.27	0.14
Apo A-IV	122.39	129.95	1.06	0.72
Apo E	16.46	15.34	0.93	0.47
Apo J	181.43	176.98	0.98	0.47
Beta-2-glycoprotein 1	48.15	63.03	0.76	0.47
Complement C1r	8.81	4.9	0.56	0.47
Complement factor I	6.15	10.02	1.63	0.47
Fetuin A	555.66	482.87	1.15	0.47
Hemopexin	1069.61	1033.66	0.97	0.47
HPT	218.92	147.46	1.48	0.72
Kininogen	5.27	4.37	1.20	0.07
mTTR	49.71	55.35	1.11	0.47
Protein AMBP	18.02	18.28	1.01	0.47

RESULTADOS

RBP4	131.19	106.29	1.23	0.47
SAP	15.08	11.03	0.73	0.07
Serumalbumin	24.55	20.23	1.21	1.00
Vitronectin	24.21	16.29	0.67	0.72
Zinc-alpha-2-glycoprotein	66.74	72.36	1.08	1.00

* Protein intensity, expressed as mean value of all subjects x10⁵ AU

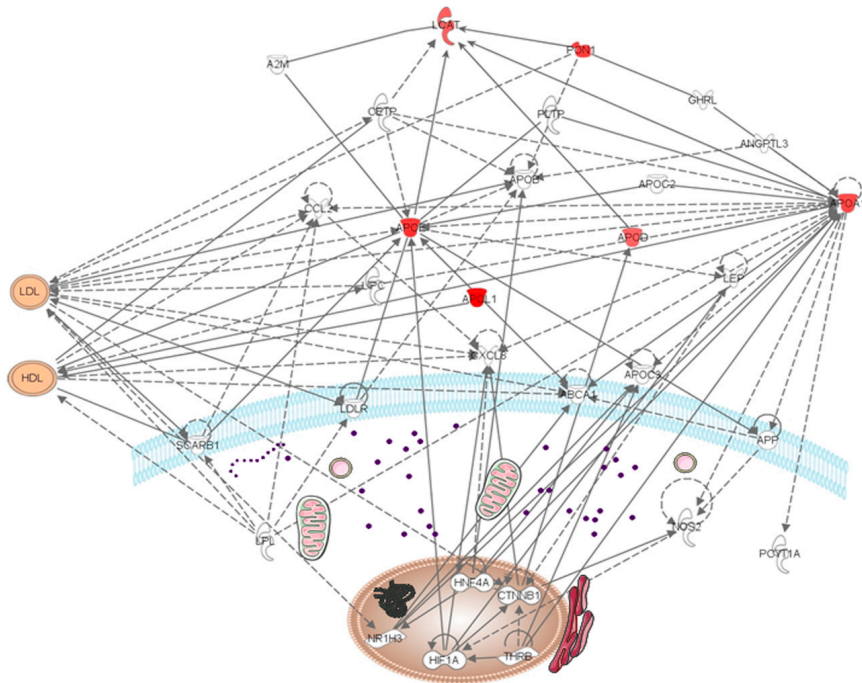
AMBP=alpha-1-microglobulin/bikunin precursor; Apo=apolipoprotein; HPT=haptoglobin; Phys=phytosterols; mTTR=transthyretin monomer; RBP4=retinol binding protein 4; SAP=serum amyloid P.

Supplemental Table S4. Protein composition in lipoprotein depleted plasma after ω 3-milk intake.

Protname	Basal	ω3	ω3/B	P Value
Alpha-1-antitripsin	2.16	2.83	0.76	0.59
Alpha-1B-glycoprotein	243.38	304.44	0.80	0.72
Alpha-2-antiplasmin	34.94	34.38	0.98	0.72
Apo A-I	3.17	4.66	0.68	0.11
Apo A-IV	133.11	150.49	1.13	1.00
Apo E	23.31	22.98	0.99	0.27
Apo J Total	213.17	215.08	1.01	1.00
Beta-2-glycoprotein 1	58	55.25	0.95	0.72
Complement C1r	12.33	12.29	1.00	0.18
Complement factor I	6.99	7.02	1.00	0.72
Fetuin A	490.18	549.62	1.12	0.47
Hemopexin	897.6	1184.26	0.76	0.14
HPT	178.94	200.2	1.12	0.07
Kininogen	4.63	6.68	0.69	0.47
mTTR	58.14	64.96	1.12	1.00
Protein AMBP	24.17	21.1	1.15	0.07
RBP4	118.88	142.04	0.83	0.14
SAP	18.99	17.17	0.90	0.47
Serumalbumin	27.02	24.69	0.91	0.07
Vitronectin	25.09	21.37	1.17	0.72
Zinc-alpha-2-glycoprotein	61.02	72.09	1.18	0.47

* Protein intensity, expressed as mean value of all subjects x10⁵ AU

AMBP=alpha-1-microglobulin/bikunin precursor; Apo=apolipoprotein; HPT=haptoglobin; mTTR=transthyretin monomer; RBP4=retinol binding protein 4; SAP=serum amyloid P.



Supplemental Figure S1. *In silico* analysis of HDL protein changes. Bioinformatic analysis using the Ingenuity Systems Pathway Analysis software showing specific changes in the Lipid Metabolism neural network.

ARTÍCULO 2

“Effects of a Carob-Pod-Derived Sweetener on Glucose Metabolism”

Carmen Lambert^{1,†}, Judit Cubedo^{1,2,†}, Teresa Padró^{1,2}, Gemma Vilahur^{1,2}, Sergi López-Bernal¹, Milagros Rocha³, Antonio Hernández-Mijares^{3,4} and Lina Badimon^{1,2,5,*}

¹ Program ICCV-Cardiovascular Research Center, Institut de Reserca, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, IIB-Sant Pau, 08025 Barcelona, Spain

² Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Cardiovasculares, Ciber CV, Instituto de Salud Carlos III, 28029 Madrid, Spain

³ Service of Endocrinology, University Hospital Dr Peset, Foundation for the Promotion of Health and Biomedical Research in the Valencian Region (FISABIO), 46020, Valencia, Spain

⁴ Department of Medicine, University of Valencia, 46010, Valencia, Spain

⁵ Cardiovascular Research Chair, UAB, 08025, Barcelona, Spain

† Both authors contributed equally to the work.

Nutrients, February 2018, 10(3). pii: E271.

doi:10.3390/nu10030271.

Factor de impacto (2018):4.171

RESUMEN:

Efectos de un edulcorante a base de algarroba en el metabolismo de la glucosa

Los paciente con diabetes mellitus tipo 2 (DM-2) tienen una mayor incidencia de eventos cardiovasculares. La ingesta de dietas altas en glucosa, especialmente el consumo de bebidas azucaradas, ha sido asociado con el desarrollo de DM-2, así como de la enfermedad

cardiovascular. Hemos investigado los efectos de la ingesta de bebidas edulcoradas, obtenidas a partir de carbohidratos naturales que contienen Pinitol (PEB), comparado con la ingesta de bebidas azucaradas a partir de sacarosa (SEB) en el contexto de la intolerancia a la glucosa y la diabetes. Para esto, el estudio se dividió en tres fases: (1) fase de descubrimiento, en la que se investigó el perfil proteómico del plasma de voluntarios sanos e intolerantes a la glucosa mediante técnicas de electroforesis bidimensional seguida de espectrometría de masas (MALDI-TOF-TOF); (2) una fase de verificación donde se investigaron potenciales mecanismos asociados a los cambios proteicos observados en el estudio proteómico. En esta fase se incluyó un tercer grupo de voluntarios con DM-2; (3) Los resultados se validaron en un estudio intervencional con un modelo animal de ratas con DM-2.

La ingesta diaria, durante seis semanas, de una bebida edulcorada enriquecida en Pinitol, produjo un aumento significativo en la expresión de dos proteínas relacionadas con la vía de secreción de la insulina, el Insulin-like growth factor acid labile subunit (IGF1BP-ALS; incremento de 1,3; $P=0,028$) y el complemento C4A (incremento de 1,83; $P=0,028$), en pacientes con intolerancia a la glucosa, pero no en voluntarios sanos. Los cambios en C4A se observaron también en las muestras de suero de ratas *Zucker diabetic fatty* (ZDF) tras cuatro semanas de ingesta de la bebida rica en Pinitol, comparado con los niveles basales ($P=0.042$). Además, aumentó la expresión del gen del transportador de glucosa GLUT-2 en el yeyuno de las ratas suplementadas con Pinitol, comparado con las ratas suplementadas con sacarosa ($P=0,003$). Este cambio presentaba una correlación con los cambios observados en la proteína C4A.

Nuestros resultados sugieren que la sustitución de sacarosa con un edulcorante hecho a partir de extractos naturales de la algarroba,

induce cambios en la vía de secreción de la insulina, que pueden ayudar a reducir los niveles de glucosa protegiendo las células beta. Estos mecanismos pueden tener un papel importante en la prevención de la resistencia a la insulina y la progresión de la diabetes.

Article

Effects of a Carob-Pod-Derived Sweetener on Glucose Metabolism

Carmen Lambert ^{1,†}, Judit Cubedo ^{1,2,†}, Teresa Padró ^{1,2}, Gemma Vilahur ^{1,2}, Sergi López-Bernal ¹, Milagros Rocha ³, Antonio Hernández-Mijares ^{3,4}  and Lina Badimon ^{1,2,5,*} 

¹ Program ICCV-Cardiovascular Research Center, Institut de Reserca, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, IIB-Sant Pau, 08025 Barcelona, Spain; clambert@santpau.cat (C.L.); jcubedo@santpau.cat (J.C.); tpadro@santpau.cat (T.P.); gvilahur@santpau.cat (G.V.); slopezb@santpau.cat (S.L.-B.)

² Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Cardiovasculares, Ciber CV, Instituto de Salud Carlos III, 28029 Madrid, Spain

³ Service of Endocrinology, University Hospital Dr Peset, Foundation for the Promotion of Health and Biomedical Research in the Valencian Region (FISABIO), 46020 Valencia, Spain; Milagros.Rocha@uv.es (M.R.); hernandez_antmij@gva.es (A.H.-M.)

⁴ Department of Medicine, University of Valencia, 46010 Valencia, Spain

⁵ Cardiovascular Research Chair, UAB, 08025 Barcelona, Spain

* Correspondence: lbadimon@santpau.cat; Tel.: +34-93-556-5880; Fax: +34-93-556-5559

† These authors contributed equally to this work.

Received: 19 December 2017; Accepted: 16 February 2018; Published: 27 February 2018

Abstract: Background: Patients with type 2 diabetes mellitus (T2DM) have a higher incidence of cardiovascular (CV) events. The ingestion of high-glycemic index (GI) diets, specially sweetened beverage consumption, has been associated with the development of T2DM and CV disease. Objective: We investigated the effects of the intake of a sweetened beverage, obtained from natural carbohydrates containing pinitol (PEB) compared to a sucrose-enriched beverage (SEB) in the context of impaired glucose tolerance (IGT) and diabetes. Methods: The study was divided in three different phases: (1) a discovery phase where the plasma proteomic profile was investigated by 2-DE (two-dimensional electrophoresis) followed by mass spectrometry (matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight—MALDI-TOF/TOF) in healthy and IGT volunteers; (2) a verification phase where the potential mechanisms behind the observed protein changes were investigated in the discovery cohort and in an additional group of T2DM volunteers; and (3) the results were validated in a proof-of-concept interventional study in an animal model of diabetic rats with complementary methodologies. Results: Six weeks of pinitol-enriched beverage (PEB) intake induced a significant increase in two proteins involved in the insulin secretion pathway, insulin-like growth factor acid labile subunit (IGF1BP-ALS; 1.3-fold increase; $P = 0.200$) and complement C4A (1.83-fold increase; $P = 0.007$) in IGT subjects but not in healthy volunteers. Changes in C4A were also found in the serum samples of Zucker diabetic fatty (ZDF) rats after four weeks of PEB intake compared to basal levels ($P = 0.042$). In addition, an increased expression of the glucose transporter-2 (GLUT2) gene was observed in the jejunum ($P = 0.003$) of inositol-supplemented rats when compared to sucrose supplementation. This change was correlated with the observed change in C4A ($P = 0.002$). Conclusions: Our results suggest that the substitution of a common sugar source, such as sucrose, by a naturally-based, pinitol-enriched beverage induces changes in the insulin secretion pathway that could help to reduce blood glucose levels by protecting β -cells and by stimulating the insulin secretion pathway. This mechanism of action could have a relevant role in the prevention of insulin resistance and diabetes progression.

Keywords: impaired glucose tolerance; type 2 diabetes mellitus; sweetener; insulin-like growth factor; C4A complement

1. Introduction

Diabetes is a chronic degenerative disease [1], characterized by hyperglycaemia caused by defects in insulin activity, secretion, and/or metabolism [2], that has become an epidemic and is now one of the biggest health challenges [3]. Type 2 diabetes mellitus (T2DM) represents the vast majority of cases worldwide [2] and millions of people are at high risk of developing T2DM, or suffering impaired glucose tolerance (IGT), which is a prediabetes state [4]. The relationship between T2DM and cardiovascular disease (CVD) is well established, since patients with diabetes mellitus have an increased risk of developing CVD [5,6]. Recent prospective studies have linked a food high-glucose index (GI) diet in the pathogenesis of CVD, T2DM, and obesity [7,8], and carbohydrate intake with an elevated risk of mortality [9]. Several studies have shown a link between the consumption of beverages with artificial and/or natural sweeteners and the risk of developing T2DM [10], related metabolic disorders [11] and CVD [12,13]. Beverages with carbohydrate-based sweeteners promote weight gain and contribute to an increased risk of T2DM not only through obesity but also due to the glycaemic effects derived from the consumption of large amounts of rapidly absorbable sugars. Interest has focused on recommending the intake of low-GI beverages with natural sweeteners to both prevent the development of diabetes and effectively manage diabetic patients [14,15]. A continuous association between fasting blood glucose levels and CVD, in both diabetic and non-diabetic patients, has suggested that all individuals may benefit from blood glucose level lowering strategies.

A new carbohydrate-based beverage extracted from carob pods containing pinitol, has been shown to improve the postprandial glycaemic response in healthy individuals as opposed to sucrose-based beverages [16,17]. Normal western diets provide between 0.5 g and 0.7 g of inositol per day, mainly through vegetables and fruits [18]. Reduced pinitol levels were observed in impaired glucose tolerance and diabetic patients [19]. To prevent or ameliorate diabetes mellitus (DM), the normal supplementation dose of inositol is between 2 g/day and 4 g/day [20]. The aim of the present study was to identify by proteomic approaches and experimental proof-of-concept studies, the potential mechanisms behind improvement in the glycaemia response pattern associated with the regular and chronic ingestion of a pinitol-enriched beverage.

2. Materials and Methods

2.1. Human Study

2.1.1. Subjects and Study Design

Two groups of volunteers were studied. Healthy volunteers (HV; $N = 40$) and overweight volunteers with impaired glucose tolerance (IGT; $N = 40$). A third group of T2DM ($N = 38$) patients was also included in the validation phase. All subjects were recruited at the University Hospital Dr. Peset, Valencia and the study was designed as previously described [16,17,21,22].

Briefly, the subjects included in the study had an age range of 18–72 years; a body mass index (BMI) range of 19–40 Kg/m² and clinically normal biochemical parameters. The inclusion criteria for IGT subjects was fasting glycaemia levels between 100 mg/dL and 125 mg/dL on at least two previous occasions and/or a HbA1c range of 5.7–6.4%. Type 2 diabetes was defined according to the American Diabetes Association guidelines [2]. Exclusion criteria were type 1 diabetes, malignant neoplasm, triacylglycerols (TG) > 400 mg/dL, macrovascular complications, patients with poorly controlled type 2 diabetes (HbA1c $\geq 8\%$) or who were being treated with insulin or intestinal disaccharidase inhibitors.

The study was conducted according to the guidelines laid down in the Declaration of Helsinki, and all procedures involving human subjects were approved by the university hospital Dr. Peset Ethics Committee on 28 March 2012 (Project code: FRUIT UP/01; Committee code: 11/12). Written informed consent was obtained from all patients.

This was a randomized, double-blind study, as previously described [17,21,22]. Each group of volunteers was then divided into two subgroups. One subgroup received a sucrose-enriched beverage

(SEB) as a placebo and the other received a carob-pod, pinitol-enriched beverage (PEB; Fruit Up[®]; ADM&WILD-Valencia SAU, Valencia, Spain) [17,21,22]. The PEB consisted of a complex mixture of naturally-occurring soluble carbohydrates (including mono-, di-, oligo-saccharides and polyols, mainly pinitol, myoinositol plus D-chiro-inositol–soluble fibre) and minor compounds (organic acids, minerals, aminoacids) derived from carob pods. The sucrose-based beverage contained very similar amounts of non-polyol soluble carbohydrates, macronutrient composition and total number of calories to the PEB, but excluded inositols (Table 1). The sweetness and energy supply of inositols compared to other common sweeteners is showed in Supplementary Table S1. This trial was registered on clinicaltrials.gov under the study number NCT01754792.

Table 1. Pinitol/sucrose-enriched beverage characterization.

	PEB	SEB
Pinitol (g)	4.00	-
Myoinositol + D-chiro-inositol (g)	0.45	-
Sugars(g)	34.90	42.5
-Glucose	6.23	-
-Fructose	4.83	-
-Sucrose	37.29	42.5
-Others	0.58	-
Oligosaccharides (g)	0.05	-
Soluble fibre (g)	1.65	-
Total carbohydrates (g)	41.18	42.50
Total available carbohydrates (g)	39.12	42.50
Total calories (kcal)	155.0	170.0

Nutritional composition of the pinitol/sucrose-enriched beverage per 500 mL (daily dose).

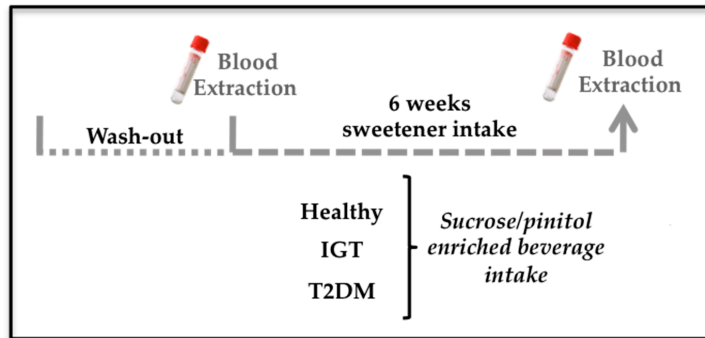
The anthropometric and biochemical profile of the study population has been previously reported [16,17,21,22] for healthy subjects, IGT subjects and in T2DM patients. (For further information, see Supplementary Material).

2.1.2. Blood Collection and Sample Preparation

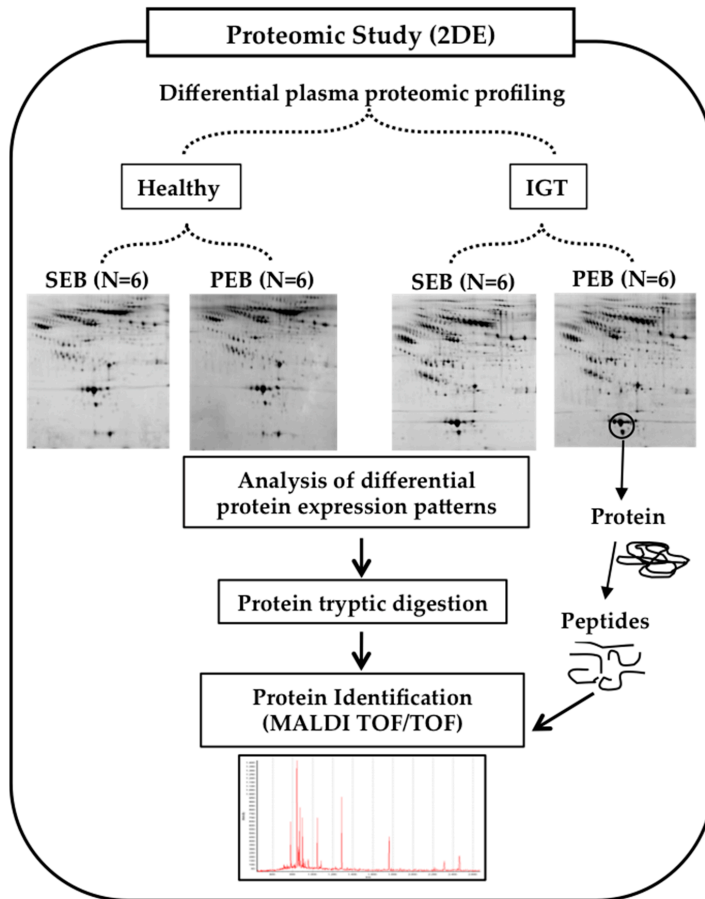
Venous blood samples from the volunteers were collected by the volunteers at 8–10 am after 12 h overnight fasting at the moment of inclusion (T0) and after six weeks (T6) of intake of the supplemented beverages (Figure 1a; baseline and endpoint of the study). Blood samples were collected in anticoagulant-free Vacutainer tubes for serum preparation. Serum fractions were separated by centrifugation at 3.000× g at 4 °C for 20 min, aliquoted and then stored at –80 °C in Valencia [16,17,21,22]. Sample aliquots were transported in dry ice to Barcelona for the present mechanistic study. All samples were kept without thawing at –80 °C until used.

2.1.3. Sample Preparation

For proteomic studies, serum samples were prepared as previously reported [23–25]. Briefly, samples were sonicated (six cycles of 15 s each) in ice and filtrated (0.22 μm) by centrifugation to avoid the presence of impurities. The six most abundant serum proteins were depleted using a specific affinity cartridge with binding capacity for albumin, IgGs, IgAs, transferrin, antitrypsin, and haptoglobin (Multiple Affinity Removal Spin Cartridge, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), as reported by the providers. Serum depleted samples (called the total serum fraction) were concentrated and desalted by centrifugation with 5 kDa cutoff filter devices and sample buffer was exchanged to a urea-containing buffer (8 M urea, 2% CHAPS). The protein concentration in the serum extracts was measured with a 2D-Quant Kit (GE Healthcare, Little Chalfont, UK). All processed samples were stored at –80 °C until used.



(a)



(b)

Figure 1. Human study design (a) Blood samples were obtained before and after six weeks of daily sucrose/pinitol-enriched beverage supplementation; (b) Study workflow. A proteomic approach was used to identify changes in the proteomic profile of the different plasma fractions of healthy and impaired glucose tolerance (IGT) volunteers after the intake of the sucrose/pinitol-enriched beverage (N = 6 each group).

2.1.4. Proteomic Analysis

The proteomic serum profile of six volunteers from each group and condition were randomly selected and analyzed by two dimensional gel electrophoresis (2-DE) and mass spectrometry (MS) (Figure 1b).

Two-Dimensional Gel Electrophoresis

A protein load of 100 µg (analytical gels) and 300 µg (preparative gels) of the urea/chaps serum extracts was applied to 17-cm dry strips (pH 4–7 linear range; BioRad). The second dimension was resolved in 10% SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis). Gels were developed by fluorescent staining (Flamingo; BioRad, Hercules, CA, USA). For each independent condition, 2-DE for protein extracts from the baseline and the post-intake of placebo or Fruit-Up® were processed in parallel to guarantee maximum comparability. Analysis for differences in the protein profiles was performed with the PD-Quest 8.0 software (BioRad, Hercules, CA, USA). Each spot was assigned a relative value that corresponds to the single spot volume compared to the volume of all the spots in the gel, following background extraction and normalization between gels [26].

Mass Spectrometry Analysis

Proteins were identified after in-gel tryptic digestion and the extraction of peptides from the gel pieces, as previously described [24,27], by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) using an AutoFlex III Smartbeam MALDI-TOF/TOF (Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA). Samples were applied to Prespotted AnchorChip plates (Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA) surrounding the calibrants provided on the plates. Spectra were acquired with flexControl in reflector mode (mass range: 850–4000 m/z , reflector 1: 21.06 kV; reflector 2: 9.77 kV; ion source 1 voltage: 19 kV; ion source 2: 16.5 kV; detection gain: 2.37x), with an average of 3500 added shots at a frequency of 200 Hz. Each sample was processed with flexAnalysis (version 3.0, Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA) considering a signal-to-noise ratio over three, applying statistical calibration and eliminating background peaks. For identification, peaks between 850 m/z and 1000 m/z were not considered. After processing, spectra were sent to the BioTools interface (version 3.2, Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA) and a MASCOT server search on Swiss-Prot 57.15 database was carried out (taxonomy: homo sapiens, mass tolerance 50 to 100, up to two trypsin miss cleavages, global modification: carbamidomethyl (C), variable modification: oxidation (M)). Identified proteins were accepted when a mascot score higher than 52 was obtained by peptide mass fingerprint and confirmed by peptide fragmentation was working in the reflector mode.

Quantification of Protein Serum Levels

A commercial sandwich-based ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) kit was used to measure total IGF-I (Insulin-like growth factor-I) levels in the serum samples before and after the intake of PEB by the control ($N = 20$) and IGT volunteers ($N = 20$). In addition, a group of diabetic patients was included ($N = 19$). The detection range of the kit was 2.0–50 ng/mL (IGF-I ELISA E20, Human Insulin-Like Growth Factor-I ELISA Kit; Mediagnost, Budapest, Hungary).

2.2. Animal Study

The study protocol was approved by the institutional ethics committee “Animal Experimentation Committee of the Cardiovascular Research Centre (CSIC-ICCC)” conforming to the position of the American Heart Association (AHA) on Research Animal Use adopted by the AHA on 11 November 1984. All procedures fulfilled the criteria established by the “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals” published by the United States National Institutes of Health (NIH; NIH Publication No.85-23, revised 1996).

Animals were housed in the ICCC (Instituto Catalán de Ciencias Cardiovasculares) animal facilities in a dedicated room with controlled temperature ($22 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$), humidity (60%), and lighting (12 h light–dark cycles).

2.2.1. Animal Model

Male Zucker diabetic fatty (ZDF) rats ($350 \text{ g} \pm 30 \text{ g}$; 12 weeks-old; $N = 10$) supplied by Charles River (Barcelona, Spain) were used as an animal model of severe T2DM. ZDF rats progress to T2DM due to insulin resistance and express abnormalities such as early hyperinsulinemia (that quickly decreases as the β -cells fatigue), hyperglycemia, glucose intolerance, hyperlipidemia, mild nephropathy and hyperleptinemia [28].

ZDF rats were fed a diet with high protein, carbohydrate and fat levels to develop diabetes (LabDiet® 5008 Formulab, P.O. Box 19798 St. Louis, MO, USA). The study was conducted in rats under a pinitol-free diet to avoid potential interactions. Animals were provided with food and water ad libitum.

2.2.2. Experimental Design

ZDF rats were randomized into two parallel groups (1:1) receiving the low-glycemic index pinitol solution (PEB; intervention group) or a sucrose solution (SEB; control group).

Animals were administered a 1.15 g/kg carob-pod pinitol preparation, equivalent to a daily dose of pinitol in humans, as tested in previous studies [16]. The dose of sucrose was calculated in order to ensure that all animals received the same amount of non-polyol carbohydrates and total energy as those obtained by PEB intake (0.90 g/kg). Animals were administered daily for four weeks (28 days) by gastric gavage of either sucrose or pinitol solution. On days 1 and 28 (after a 4-h time period of food deprivation) blood was collected from the tail vein, for the blood glucose level analysis (Glucocard™ Memory 2 meter, Menarini Diagnostics, Firenze, Italy; Figure 2). Animals were kept conscious in order to avoid potential transient hyperglycemia caused by sedation [29].

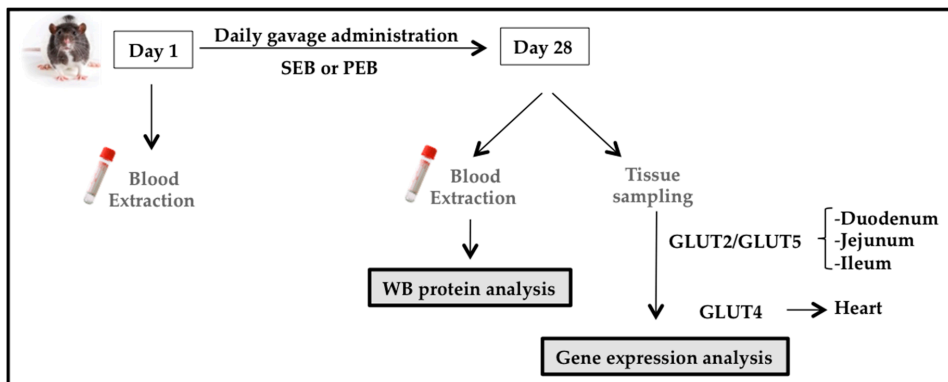


Figure 2. Zucker diabetic fatty (ZDF) rat study design. Blood samples were obtained at baseline and after 28 days of sucrose/pinitol-enriched beverage administration. Tissues were obtained, frozen in liquid nitrogen and stored at $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ until used.

Upon completion of the experiment on day 28, the animals were deeply anesthetized with a mixture of ketamine (75 mg/kg) + medetomidine (0.5 mg/kg) + buprenorphine (0.1 mg/kg) and euthanized with an intracardiac injection of a pentobarbital overdose (400 mg/kg). A portion of duodenum, jejunum, ileum, large intestine and the heart were extracted and cleaned to avoid bacterial RNase interference, immediately frozen in liquid nitrogen and stored at $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ until processed.

2.2.3. Western Blot Analysis

Protein extracts were resolved by 1-DE under reducing conditions and electrotransferred to nitrocellulose membranes in semi-dry conditions (Trans-Blot Turbo system; BioRad, Hercules, CA, USA). C4A complement detection was performed using a rabbit policlonal antibody against a recombinant fragment corresponding to a region within amino acids 23-302 of the protein (NBP2-14,893, 1:1000 dilution, Novus bio, Littleton, CO, USA). Band detection was performed using a chemiluminiscent substrate dye (SuperSignal® West Dura Extended Duration Substrate, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) and a molecular imager ChemiDoc XRS System, Universal Hood II (BioRad, Hercules, CA, USA). Band quantification was performed with Image Lab 4.0 software (BioRad laboratories, Hercules, CA, USA). The protein load was normalized with total protein staining, as previously described [27].

2.2.4. Glucose Transporter mRNA Expression

We evaluated the potential effect of the intake of PEB on the expression of three main glucose transporters: GLUT2, GLUT4 and GLUT5. Due to the tissue specificity and pinitol absorption, we measured GLUT2 and GLUT5 in the duodenum, jejunum and ileum, and GLUT4 in the heart. To this end, the aforementioned samples were pulverized in liquid nitrogen and mRNA was isolated using the Tripure™ Isolation Reagent (Roche Molecular Biochemicals, Pleasanton, CA, USA) according to the manufacturer’s instructions and then gene expression was assessed by real-time PCR analysis; GLUT2 (Rn00563565, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), GLUT4 (Rn01752377, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and GLUT5 (Rn00582000, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

2.3. Statistical Analysis

Data are expressed as mean and standard error (SEM) unless stated. N indicates the number of subjects tested. Statistical analysis was performed with Stat View 5.0.1 software (SAS Institute, Cary, NC, USA). Differences between the basal condition and after six weeks of intake of the pinitol-enriched beverage were tested using a repeated measurement Willcoxon analysis. Differences between groups were tested with a nonparametric Mann–Whitney test. A p-value ≤ 0.05 was considered significant.

3. Results

3.1. Pinitol-Enriched Beverage Intake Induces Serum Proteomic Changes in Proteins Related to the Insulin Secretion Pathway

Six weeks of pinitol-enriched beverage intake induced a significant decrease in glucose levels both in IGT and healthy subjects (P = 0.03). On the contrary, sucrose intake induced an increase in glucose levels in both groups of volunteers (P = 0.03; Table 2; Supplemental Figure S1).

Table 2. Biochemical characteristics of the subjects selected for the proteomic study.

	Healthy Subjects						IGT Subjects					
	SEB (N = 6)			PEB (N = 6)			SEB (N = 6)			PEB (N = 6)		
	T0	T6	P Value	T0	T6	P Value	T0	T6	P Value	T0	T6	P Value
Cholesterol (mg/dL)	192	202	0.022 *	183	178	0.398	197	203	0.602	189	194	0.798
cLDL(mg/dL)	112	125	0.004 *	109	108	0.706	104	130	0.266	122	125	0.824
cHDL (mg/dL)	54	52	0.283	55	52	0.047 *	54	53	0.734	42	43	0.812
TG (mg/dL)	126	125	0.934	88	89	0.802	111	101	0.379	121	128	0.797
Urea (mg/dL)	24	26	0.168	32	34	0.445	41	35	0.028 *	43	35	0.01 *
Glucose (mg/dL)	87	92	0.057	98	89	0.003 *	100	103	0.003 *	120	105	<0.001*

T0 corresponds to the day of inclusion in the study and T6 six weeks after the intake of pinitol-enriched beverage (PEB) or sucrose-enriched beverage (SEB). * Significant change T0 vs. T6. P value ≤ 0.05.

In order to investigate the proteins involved in the observed glucose-lowering-effect of PEB, we analyzed the serum proteomic profile of both IGT and healthy subjects at baseline and after six weeks of pinitol or sucrose-enriched beverage intake.

Among the identified proteins, IGF1BP-ALS (IGF1—insulin-like growth factor 1; BP—binding protein; ALS—acid labile subunit; MW = 63kDa; pI = 6.13) was detected in the 2-DE analysis as a cluster of two different spots that showed an increased change in IGT volunteers after PEB intake compared to sucrose intake ($P = 0.028$; Figure 3a). On the contrary, no differences were detected in the healthy subjects (Supplemental Table S1).

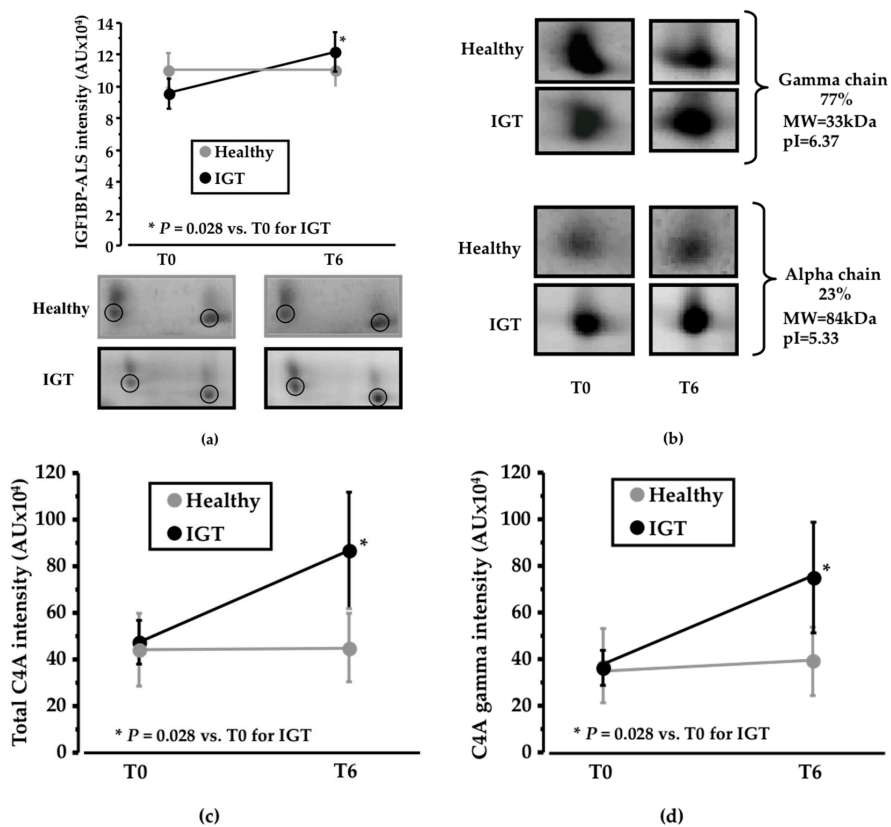


Figure 3. Changes in the proteomic profile. (a) Line diagram and representative 2-DE (two-dimension electrophoresis) images showing IGF1BP-ALS (Insulin-like growth factor-1 binding protein acid labile subunit) change after six weeks of sucrose/pinitol-enriched beverage intake. Change in IGF1BP-ALS level was higher in IGT patients compared to healthy subjects ($N = 6$; $P = 0.200$) is observed in IGT patients; (b) Representative 2-DE images of C4A complement alpha and gamma chain. Alpha chain corresponds to the 27% of the total C4A complement identified complement. Gamma chain represents the 77% of the total C4A complement identified protein (c) Line diagram showing total C4A complement change of both healthy and IGT volunteers after the intake of the pinitol-enriched beverage. A significant change increase of the C4A complement level ($N = 6$; $P = 0.02$) is observed in IGT patients; (d) Line diagram showing C4A complement gamma chain of both healthy and IGT volunteers after the intake of the pinitol-enriched beverage. A significant change increase of C4A complement level ($N = 6$; $P = 0.02$) is observed in IGT patients.

Together with changes in IGF1BP-ALS, complement C4A also showed a significant shift in its distribution profile in IGT subjects, but not in healthy subjects. C4A was identified as two different chains, the gamma chain (MW = 33 kDa; pI = 6.37), which corresponds to 77% of total protein intensity, and the alpha chain (MW = 84kDa; pI = 5.33), that represents 23% of total protein intensity (Figure 3b). Total C4A levels showed a significant increase ($P = 0.028$; Figure 3c) in IGT subjects after six weeks of dietary supplementation with PEB compared to sucrose intake. No differences were found in the alpha chain, whereas a significant increase in the IGT subjects after the intake of the PEB was observed in the gamma chain ($P = 0.028$; Figure 3d) when compared to sucrose intake. On the contrary, no differences in C4A expression were detected in the healthy group (Supplemental Table S1).

3.2. Potential Mechanisms Involved in the Peb Glucose Modulating Effect

Since the acid labile subunit (ALS) was found increased in the proteomic analysis, and ALS binds IGF-1 [30], we measured the total IGF-1 serum levels in the three study populations. Interestingly, both the IGT and T2DM subjects showed significantly lower basal serum levels of IGF-1 when compared to healthy subjects ($N \geq 19$ in each group; $P < 0.001$; Figure 4). However, no differences were observed in IGF-1 serum levels after PEB intake in any of the three groups. This means that PEB intake, while regulating ALS, has no influence on IGF-1 levels.

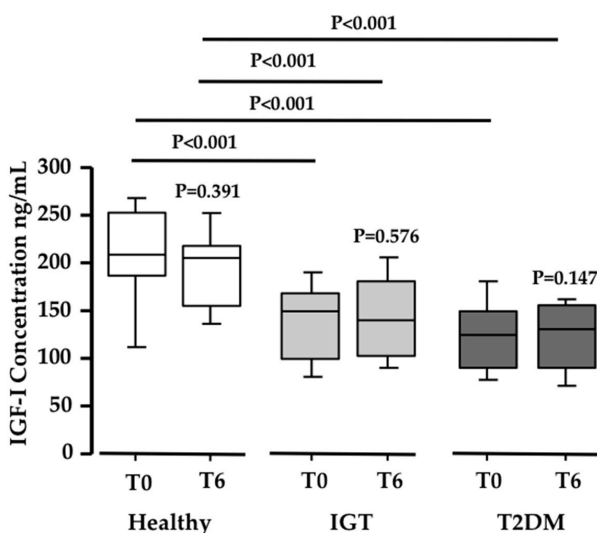


Figure 4. Changes in IGF-1 levels. Box-plot diagram showing the significant decrease in IGF1 concentration (ng/mL) in IGT and T2DM volunteers when compared to healthy subjects ($N = 20$; 20; 19 respectively; $P \leq 0.0005$).

To better understand the mechanisms related to the observed glucose reduction produced after the intake of a pinitol-enriched beverage, ZDF rats, as an animal model of diabetes, were included in the study.

Changes in C4A serum levels were confirmed in ZDF rats by Western blot analysis, showing a significant increase in this protein after four weeks of pinitol intake compared to basal levels ($P = 0.042$; Figure 5a). Leptin-receptor-deficient ZDF rats acquire a very severe phenotype, reaching an average of 400 mg/dL glucose. Interestingly, sucrose feeding induced an increase in 100 mg/dL, while the pinitol solution did not impair glycaemia (Figure 5b). To further explore the potential mechanisms behind the observed Fruit-Up®-mediated effects, we analyzed the gene expression levels of three different

glucose transporters (GLUT2, GLUT4 and GLUT5) at their major sites of expression. A significant increase of GLUT2 after dietary supplementation with the pinitol solution when compared to sucrose intake was observed in the jejunum ($P = 0.003$; Figure 5c). However, no change was observed either in GLUT4 (Figure 5d), or in GLUT5 (Figure 5e). The observed change in C4A protein levels showed a direct correlation with GLUT2 expression levels in the jejunum ($P = 0.002$; Figure 5f).

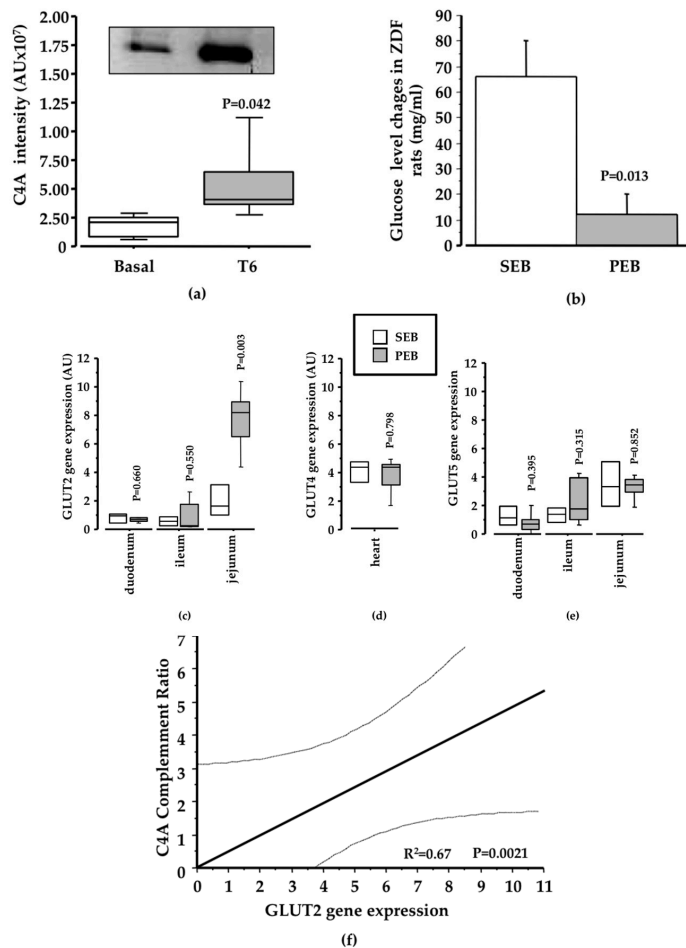


Figure 5. Results validation. (a) C4A profile in ZDF rat samples. Box-plot and representative western blot image showing changes in C4A intensity in ZDF rats supplemented with a pinitol-enriched beverage ($N = 5$; 1.21-fold change; $P = 0.04$); (b) In ZDF rats, the blood glucose level change after SEB intake was significantly higher than blood glucose level changes after four weeks of PEB intake ($N = 5$; $P = 0.01$); (c) Changes in GLUT2 levels. Box-plot diagram showing the change of the gene in the small intestine. A significant reduction in GLUT2 gene expression in the jejunum of ZDF diabetic rats supplemented with pinitol was achieved when compared with the intake of a sucrose-enriched beverage ($N = 9$; $P = 0.003$); (d) No change was observed in GLUT4 after pinitol-enriched beverage intake; (e) No change in GLUT5 was achieved after pinitol-enriched beverage intake; (f) A significant positive correlation was observed between the increase of C4A intensity and the level of GLUT2 achieved ($P = 0.002$).

4. Discussion

The refined sugar intake steadily increased in the last years and it is nowadays the most commonly used sweetener for foods and beverages contributing to the high glycaemic indices of this diet [31]. High glycaemic index diets have been linked to the development of diverse metabolic diseases such as obesity, decreased insulin sensitivity, an elevated risk of developing diabetes [32] and are a risk factor for coronary heart disease [33]. Thus, the reduction of glucose levels is one of the main objectives to prevent and treat diabetes [34].

Previous studies with pinitol-enriched beverages have demonstrated a significant reduction in the post-prandial glycaemic response and glucose levels both after 24 h [16,35] and after 12 weeks of daily consumption [17] in healthy volunteers, when compared with a sucrose-based beverage. Also, its daily oral ingestion positively impacts insulin resistance [22].

Here, we have analyzed the serum proteomic profile in IGT and in healthy subjects after the intake of the pinitol-enriched beverage (PEB), to investigate the mechanisms associated with the improvement in the glycaemic response previously observed. With this aim, pair comparisons of protein-intensity values between basal conditions (before intervention) and after six weeks of PEB/SEB intake were performed for each individual. This proteomic study was based on 24 subjects randomly chosen among the total study population (six/study group) and the suitability of the groups was based on the consistent response of the plasma glucose levels to the interventions. Importantly, a significant change in the two proteins closely related with β -cell insulin secretion, IGF1BP-ALS and C4A, was observed only in IGT volunteers. IGT patients have an altered glucose metabolism compared to healthy subjects, supporting the view that IGT patients have different responses to glucose metabolism than healthy subjects. However, the findings of this proteomic approach should be further assessed in new prospective studies specifically designed to this aim.

There are multiple β -cell-related factors involved in impaired insulin secretion, such as the reduction of β -cell mass, glucotoxicity and lipotoxicity [36]. Insulin is packed into β -cells in small granules like proinsulin, the first inactive form of insulin, with a hexameric crystalline structure, formed by six insulin units [37]. Most diabetic patients have already lost 70–80% of their original β -cell mass [38]. Each β -cell contains more than 10,000 granules, so its protection is an important strategy to prevent impaired insulin secretion [39,40]. These granules are then secreted from β -cells as proinsulin, which is composed of an insulin chain attached to C-peptide (Figure 6). IGF-1 reduces β -cell inflammation, protecting from apoptosis and promoting proliferation [41]. Therefore, the relationship of IGF-1 with the prognosis of T2DM has been widely studied. In fact, low levels of IGF-1 are related with obesity and impaired glucose tolerance [42]. In addition, IGF-1 is related with C-peptide secretion and β -cell regeneration (Figure 6) and low IGF-1 levels are associated with reduced insulin secretion and can be an important marker of β -cell function [43]. In this context, the search for strategies to maintain the levels of IGF-1 is very important to preserve β -cell function. In line with this, we found decreased IGF-1 serum levels in IGT and T2DM subjects. Importantly, IGF-1 is mainly found in a complex with one of its binding proteins (BP) and with the acid-labile subunit (ALS) [44]. ALS is an essential component to maintain the integrity of IGF-1 [44]. IGF-1 as a free molecule has a half-life shorter than 12 min, whereas this rises to 12 h when forming a complex with ALS and its BPs [30,45,46]. In this respect, ALS deficiency in humans has been characterized by a severe reduction in IGF-1 levels and insulin insensitivity [44]. Here, we have observed that the regular consumption of the pinitol-enriched beverage induced a significant increase in ALS levels in those volunteers suffering impaired glucose resistance. These results suggest that the intake of a pinitol-enriched beverage might help maintain IGF-1 levels by increasing levels of ALS, therefore improving IGF-1 stability in patients with impaired glucose metabolism. Indeed, nowadays it is recognized that the importance of a protein in a pathology lies not only in the total levels, but also in its stability, conformation and ability to make up complexes.

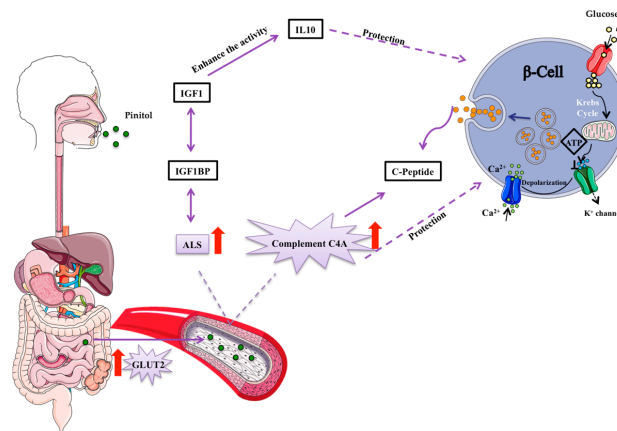


Figure 6. Suggested mechanism of pinitol-induced effects on the insulin secretion pathway. Pinitol is a glucose mimetic molecule, which is absorbed in the small intestine and distributed through the bloodstream to the whole organism. An increase in the acid labile subunit (ALS) and C4A complement proteins induce a protection of β -cells. Pro-preinsulin granules are packed inside pancreatic β -cells and secreted outside the cell as insulin, in response to nutrient intake.

Besides changes in IGF1BP-ALS, an increase in C4A complement was also observed. C4A is a non-enzymatic component of the complement system, which takes part in the initial steps of the complementary pathway. The complement system is involved in several processes including the dysregulation of adipose tissue metabolism, inflammation, endothelial dysfunction and insulin resistance [47,48]. The relationship between C4A and the progression and prognosis of T2DM has not been widely studied. However, the relationship between C4A levels and insulin-dependent DM has been previously demonstrated [49,50]. In fact, low levels of this protein appear after high glucose intake [51]. Also, higher levels of C4A are associated with higher levels of C-peptide (Figure 6), indicative of enhanced insulin secretion [52,53]. C4A protein has been also suggested to protect β -cells [53] and it is involved in innate immunity [50,54,55]. With all this in mind, we sought to investigate the potential mechanism behind the increase in C4A protein levels induced by the intake of a pinitol-enriched beverage. For this purpose, we used leptin-receptor-deficient ZDF rats as an animal model of highly severe T2DM and compared those receiving PEB with those treated with sucrose solution, used as control group. While in those rats receiving sucrose a significant increase in blood glucose levels was observed, in those rats that received the PEB, glucose levels remained at the baseline. Higher levels of C4A were also found in ZDF rats after the intake of a pinitol solution when compared to sucrose intake, confirming the results of the proteomic study in humans and suggesting a potential implication of this protein in the regulation of blood glucose levels induced by the administration of the pinitol solution. β -cell protection achieved by C4A has been related to glucose transport across the plasma membrane [53]. Interestingly, we observed a significant increase in the expression of the glucose transport 2 (GLUT2) in jejunum after the regular intake of pinitol. This glucose transport is located in multiple organs and tissues, the small intestine, the pancreas, the liver and the brain. GLUT2 plays a very important role in glucose homeostasis control by an inter-organ communication system [56], including the passive movement of glucose through the cellular membrane of β -cells [57,58]. Importantly, we found that the increase in GLUT2 expression in the jejunum of ZDF rats, where pinitol is absorbed to be further distributed through the whole organism, was directly associated with the increase in C4A protein levels after pinitol intake, which suggests a protective effect on the pancreatic beta cells [53], explaining the significant difference in glucose levels after PEB and SEB interventions. In severely advanced T2DM states, as occurs

in our animal model, multiple alterations within several metabolic signalling pathways, including the desensitization of GLUT2 translocation and the disruption of the insulin regulation of glucose absorption may developed. The enzyme glucokinase and GLUT2 comprise the glucose sensing system, regulating insulin secretion from pancreatic β -cells in response to nutrient intake and, therefore, preventing excessive blood glucose transport after a sugar-rich meal [59,60]. Of note, regular intake of the pinitol-enriched beverage was demonstrated to exert an insulin-mimetic activity in healthy subjects without affecting insulin secretion [16]. In fact, previous recent studies have shown the favourable effects of pinitol on the treatment of insulin-related disorders because of its insulin-like function (e.g., reduces blood glucose levels in T2DM patients) [35,61]. In this regard, we observe that the regular intake of pinitol induces a coordinated increase in C4A and GLUT2 in ZDF rats, helping to improve their metabolic system.

Diabetes mellitus is associated with β -cell destruction, so its regeneration and protection remain key strategies for the prognosis of the disease [62]. Our results suggest for the first time that the substitution of a normal sugar source with a naturally-based, pinitol-enriched beverage in IGT subjects could help to attenuate glucose metabolism disruption by inducing a coordinated change in C4A complement and IGF1BP-ALS, two important molecules with direct implications on β -cell survival. Furthermore, changes in C4A complement seem to be related to an increase in the expression of the glucose transporter GLUT2 (Figure 6). Future studies on the differential pattern of glucose transporters in various tissues, including liver and pancreas, would help the better understanding of the mechanisms directly associated with the beneficial effects on glucose metabolism after PEB intake. Therefore, we propose that the substitution of sucrose by carob pod sweetener may help efforts to normalize an impaired glucose metabolism, and to reduce the risk associated with the intake of processed sugars.

Limitations of the Study

The manuscript referred to a proteomic discovery design aimed at identifying the differential protein signatures associated with the glycaemic pattern after the regular and chronic ingestion of a pinitol-enriched beverage. Specifically, the main goal of the study was to highlight proteins potentially involved in the glycaemic response to the intervention with pinitol. However, further studies are needed to better explain mechanisms and pathways associating the pinitol intervention with changes in glucose metabolism. Thus, measuring GLUT2 in pancreas tissue would provide extra information on the beta-cell response to pinitol intake. Unfortunately, we do not have pancreas tissue to perform this analysis.

Supplementary Materials: The following are available online at www.mdpi.com/2072-6643/10/3/271/s1, Figure S1: Cell line chart showing the individual glucose change of each subject after 6 weeks of PEB or SEB supplementation, Table S1: Sugars characterization, Table S2: Changes in the proteomic profile after SEB intake.

Acknowledgments: The technical assistance of María Dolores Fernández and Ona Catot is gratefully acknowledged. Authors are indebted to Josep Moreno for the animal support. Finally, the authors thank the study participants for their valuable contribution and ADM&WILD-Valencia SAU especially R Salom and R Garcia-Bou, for providing the products used in the study. This work was supported by grants from CDTI Spanish Ministry of Competitiveness and Economy (MINECO) (CEN-20101016 (HEFUFOD) to L.B.); the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness of Science [SAF2016-76819-R to L.B.]; Institute of Health Carlos III, ISCIII [TERCEL RD16/00110018 to L.B.; and CB16/11/0041 to L.B.; and FIS PI16/01915 to T.P.; PI16/00301 and PI15/01424 to M.R. and A.H.]; FEDER “Una Manera de Hacer Europa”; the Secretary of University and Research, Department of Economy and Knowledge of the Government of Catalonia [2014SGR1303 to L.B.]; “CERCA Programme/Generalitat de Catalunya” Spain; the Valencian Regional Ministry of Education [GV/2016/169 to M.R. and A.H.]; and FISABIO, Valencia, Spain [UGP-15-220 to M.R. and A.H.]. C.L. is recipient of a pre-doctoral grant from the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness of Science [BES-2014-068269] and M.R. is recipient of a Miguel Servet tipo II contract (CPII16/00037). We thank FIC-Fundacion Jesús Serra, Barcelona, Spain, for their continuous support.

Author Contributions: C.L. designed and conducted the research, analyzed data and performed the statistical analysis, and wrote the manuscript. J.C. designed and conducted the research, analyzed data and performed the statistical analysis, and wrote the manuscript. G.V. designed and supervised the research, analyzed data and performed the statistical analysis, and wrote the manuscript. S.L.-B. designed and supervised the research,

analyzed data and performed the statistical analysis, and wrote the manuscript. T.P. designed and supervised the research, analyzed data and performed the statistical analysis, and wrote the manuscript. M.R. designed the research, provided samples, and analyzed data. A.H.-M. designed the research, provided samples, and analyzed data. L.B. designed and supervised the research, analyzed data and performed the statistical analysis, and wrote and revised the manuscript. All authors had primary responsibility for the final content and approved the final version of the manuscript.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Nathan, D.M. Diabetes: Advances in Diagnosis and Treatment. *JAMA* **2015**, *314*, 1052–1062. [CrossRef] [PubMed]
- American Diabetes Association. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* **2011**, *34* (Suppl. S1), S062–S069.
- Hossain, P.; Kawar, B.; El Nahas, M. Obesity and diabetes in the developing world: A growing challenge. *N. Engl. J. Med.* **2007**, *356*, 213–215. [CrossRef] [PubMed]
- Kanat, M.; Defronzo, R.A.; Abdul-ghani, M.A. Treatment of prediabetes. *World J. Prediabetes* **2015**, *6*, 1207–1222. [CrossRef] [PubMed]
- Erdmann, E. Diabetes and cardiovascular risk markers. *Curr. Med. Res. Opin.* **2005**, *21*, S21–S28. [CrossRef] [PubMed]
- Desai, D.; Ahmed, H.M.; Michos, E.D. Preventing cardiovascular disease in patients with diabetes: Use of aspirin for primary prevention. *Curr. Cardiol. Rep.* **2015**, *17*, 13. [CrossRef] [PubMed]
- Augustin, L.S.A.; Kendall, C.W.C.; Jenkins, D.J.A.; Willett, W.C.; Astrup, A.; Barclay, A.W.; Björck, I.; Brand-Miller, J.C.; Brighenti, F.; Buyken, A.E.; et al. Glycemic index, glycemic load and glycemic response: An International Scientific Consensus Summit from the International Carbohydrate Quality Consortium (ICQC). *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* **2015**, *25*, 795–815. [CrossRef] [PubMed]
- Lean, M.E.J.; Morenga, L. Te Sugar and Type 2 diabetes. *Sugar Diabetes* **2016**, *10*, 43–53. [CrossRef]
- Dehghan, M.; Mente, A.; Zhang, X.; Swaminathan, S.; Li, W.; Mohan, V.; Iqbal, R.; Kumar, R.; Wentzel-Viljoen, E.; Rosengren, A.; et al. Associations of fats and carbohydrate intake with cardiovascular disease and mortality in 18 countries from five continents (PURE): A prospective cohort study. *Lancet* **2017**, *6736*, 1–13. [CrossRef]
- De Koning, L.; Malik, V.S.V.; Rimm, E.B.; Willett, W.C.; Hu, F.B. Sugar-sweetened and artificially sweetened beverage consumption and risk of type 2 diabetes in men. *Am. J. Clin. Nutr.* **2011**, *93*, 1321–1327. [CrossRef] [PubMed]
- Dhingra, R.; Sullivan, L.; Jacques, P.F.; Wang, T.J.; Fox, C.S.; Meigs, J.B.; D’Agostino, R.B.; Gaziano, J.M.; Vasan, R.S. Soft drink consumption and risk of developing cardiometabolic risk factors and the metabolic syndrome in middle-aged adults in the community. *Circulation* **2007**, *116*, 480–488. [CrossRef] [PubMed]
- Malik, V.S.; Hu, F.B. Sweeteners and risk of obesity and type 2 diabetes: The role of sugar-sweetened beverages. *Curr. Diabetes Rep.* **2012**, *12*, 195–203. [CrossRef] [PubMed]
- Welsh, J.A.; Sharma, A.; Cunningham, S.A.; Vos, M.B. Consumption of added sugars and indicators of cardiovascular disease risk among US adolescents. *Circulation* **2011**, *123*, 249–257. [CrossRef] [PubMed]
- Shearer, J.; Swithers, S.E. Artificial sweeteners and metabolic dysregulation: Lessons learned from agriculture and the laboratory. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* **2016**, *17*, 179–186. [CrossRef] [PubMed]
- Connor, H.; Annan, F.; Bunn, E.; Frost, G.; McGough, N.; Sarwar, T.; Thomas, B. The implementation of nutritional advice for people with diabetes. *Diabet. Med.* **2003**, *20*, 786–807. [PubMed]
- Hernández-Mijares, A.; Bañuls, C.; Peris, J.E.; Monzó, N.; Jover, A.; Bellod, L.; Víctor, V.M.; Rocha, M. A single acute dose of pinitol from a naturally-occurring food ingredient decreases hyperglycaemia and circulating insulin levels in healthy subjects. *Food Chem.* **2013**, *141*, 1267–1272. [CrossRef] [PubMed]
- Bañuls, C.; Rovira-Llopis, S.; Falcón, R.; Veses, S.; Monzó, N.; Víctor, V.M.; Rocha, M.; Hernández-Mijares, A. Chronic consumption of an inositol-enriched carob extract improves postprandial glycaemia and insulin sensitivity in healthy subjects: A randomized controlled trial. *Clin. Nutr.* **2016**, *35*, 600–607. [CrossRef] [PubMed]
- Regidor, P.A.; Schindler, A.E. Myoinositol as a Safe and Alternative Approach in the Treatment of Infertile PCOS Women: A German Observational Study. *Int. J. Endocrinol.* **2016**, *2016*, 2–7. [CrossRef] [PubMed]

19. Davis, A.; Christiansen, M.A.; Horowitz, J.F.; Klein, S.; Hellerstein, M.K.; Ostlund, R.E. Effect of pinitol treatment on insulin action in subjects with insulin resistance. *Diabetes Care* **2000**, *23*, 1000–1005. [CrossRef] [PubMed]
20. Jones, A.G.; Hattersley, A.T. The clinical utility of C-peptide measurement in the care of patients with diabetes. *Diabet. Med.* **2013**, *30*, 803–817. [CrossRef] [PubMed]
21. Hernández-Mijares, A.; Bañuls, C.; Rovira-Llopis, S.; Álvarez, Á.; Orden, S.; Rubio-Puchol, O.; Víctor, V.M.; Rocha, M. Chronic consumption of an inositol-enriched beverage ameliorates endothelial dysfunction and oxidative stress in type 2 diabetes. *J. Funct. Foods* **2015**, *18*, 598–607. [CrossRef]
22. Bañuls, C.; Rovira-Llopis, S.; López-Doménech, S.; Veses, S.; Víctor, V.M.; Rocha, M.; Hernández-Mijares, A. Effect of consumption of a carob pod inositol-enriched beverage on insulin sensitivity and inflammation in middle-aged prediabetic subjects. *Food Funct.* **2016**, *7*, 4379–4387. [CrossRef] [PubMed]
23. Cubedo, J.; Padró, T.; García-Moll, X.; Pinto, X.; Cinca, J.; Badimon, L. Proteomic signature of apolipoprotein J in the early phase of new-onset myocardial infarction. *J. Proteome Res.* **2011**, *10*, 211–220. [CrossRef] [PubMed]
24. Cubedo, J.; Padro, T.; Garcia-Moll, X.; Pinto, X.; Cinca, J.; Badimon, L. Serum proteome in acute myocardial infarction. *Clin. Investig. Arterioscler.* **2011**, *23*, 147–154. [CrossRef]
25. Cubedo, J.; Padró, T.; Badimon, L. Coordinated proteomic signature changes in immune response and complement proteins in acute myocardial infarction: The implication of serum amyloid P-component. *Int. J. Cardiol.* **2013**, *168*, 5196–5204. [CrossRef] [PubMed]
26. Cubedo, J.; Padró, T.; García-Arguinzonis, M.; Vilahur, G.; Miñambres, I.; Pou, J.M.; Ybarra, J.; Badimon, L. A novel truncated form of apolipoprotein A-I transported by dense LDL is increased in diabetic patients. *J. Lipid Res.* **2015**, *56*, 1762–1773. [CrossRef] [PubMed]
27. Cubedo, J.; Padro, T.; Badimon, L. Glycoproteome of human apolipoprotein A-I: N- and O-glycosylated forms are increased in patients with acute myocardial infarction. *Transl. Res.* **2014**, *164*, 209–222. [CrossRef] [PubMed]
28. Tofovic, S.P.; Jackson, E.K. Rat models of the metabolic syndrome. *Methods Mol. Med.* **2003**, *86*, 29–46. [CrossRef] [PubMed]
29. Angel, I.; Bidet, S.; Langer, S.Z. Pharmacological characterization of the hyperglycemia induced by alpha-2 adrenoceptor agonists. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1988**, *246*, 1098–1103. [PubMed]
30. Rensing, K.L.; van Duyvenvoorde, H.A.; Cramer, M.J.; Teske, A.J.; Prokop, M.; Stroes, E.S.; Wit, J.M.; Hermus, A.R.M.M.; Twickler, T.B. Case report: Low circulating IGF-I levels due to Acid-Labile Subunit deficiency in adulthood are not associated with early development of atherosclerosis and impaired heart function. *Growth Horm. IGF Res.* **2011**, *21*, 233–237. [CrossRef] [PubMed]
31. Bray, G.; Popkin, B. Dietary sugar and body weight: Have we reached a crisis in the epidemic of obesity and diabetes? Health be damned! Pour on the sugar. *Diabetes Care* **2014**, *37*, 950–956. [CrossRef] [PubMed]
32. Hodge, A.M.; English, D.R.; O’Dea, K.; Giles, G.G. Glycemic index and dietary fiber and the risk of type 2 diabetes. *Diabetes Care* **2004**, *27*, 2701–2706. [CrossRef] [PubMed]
33. Denova-Gutiérrez, E.; Huitrón-Bravo, G.; Talavera, J.O.; Castañón, S.; Gallegos-Carrillo, K.; Flores, Y.; Salmerón, J. Dietary glycemic index, dietary glycemic load, blood lipids, and coronary heart disease. *J. Nutr. Metab.* **2010**, *2010*. [CrossRef] [PubMed]
34. Asif, M. The prevention and control the type-2 diabetes by changing lifestyle and dietary pattern. *J. Educ. Health Promot.* **2014**, *3*. [CrossRef] [PubMed]
35. Rafael, S.A.; Henry, C.J.K. FRUIT UP (new food ingredient from wild): Scientific review of its healthful properties. *Nutrición Clínica y Dietética Hospitalaria* **2010**, *30*, 15–25.
36. Wallace, M.; Whelan, H.; Brennan, L. Metabolomic analysis of pancreatic beta cells following exposure to high glucose. *Biochim. Biophys. Acta* **2013**, *1830*, 2583–2590. [CrossRef] [PubMed]
37. Fu, Z.; Gilbert, E.R.; Li, D. Regulation of Insulin Synthesis and Secretion and Pancreatic Beta-Cell Dysfunction in Diabetes. *Curr. Diabetes Rev.* **2012**, *9*, 25–53. [CrossRef]
38. Cnop, M.; Welsh, N.; Jonas, J.C.; Jorns, A.; Lenzen, S.; Eizirik, D.L. Mechanisms of pancreatic beta-cell death in type 1 and type 2 diabetes: Many differences, few similarities. *Diabetes* **2005**, *54* (Suppl. S2), S97–S107. [CrossRef] [PubMed]
39. Rorsman, P.; Renström, E. Insulin granule dynamics in pancreatic beta cells. *Diabetologia* **2003**, *46*, 1029–1045. [CrossRef] [PubMed]

40. Roder, P.V.; Wong, X.; Hong, W.; Han, W. Molecular regulation of insulin granule biogenesis and exocytosis. *Biochem. J.* **2016**, *473*, 2737–2756. [CrossRef] [PubMed]
41. Chen, W.; Salojin, K.V.; Mi, Q.S.; Grattan, M.; Meagher, T.C.; Zucker, P.; Delovitch, T.L. Insulin-Like Growth Factor (IGF)-I/IGF-Binding Protein-3 Complex: Therapeutic Efficacy and Mechanism of Protection against Type 1 Diabetes. *Endocrinology* **2004**, *145*, 627–638. [CrossRef] [PubMed]
42. Kajantie, E.; Eriksson, J. Serum Insulin-like Growth Factor (IGF)-I and IGF-Binding Protein-1 in Elderly People: Relationships with Cardiovascular Risk Factors, Body Composition, Size at Birth, and Childhood Growth. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2003**, *88*, 1059–1065. [CrossRef] [PubMed]
43. Thankamony, A.; Capalbo, D.; Marcovecchio, M.L.; Sleigh, A.; Jørgensen, S.W.; Hill, N.R.; Mooslehner, K.; Yeo, G.S.H.; Bluck, L.; Juul, A.; et al. Low circulating levels of IGF-1 in healthy adults are associated with reduced β -cell function, increased intramyocellular lipid, and enhanced fat utilization during fasting. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2014**, *99*, 2198–2207. [CrossRef] [PubMed]
44. Domené, H.M.; Hwa, V.; Héctor, G. Jasper; Rosenfeld, R.G. Acid-labile subunit (ALS) deficiency. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab. J.* **2011**, *25*, 101–113. [CrossRef]
45. Boisclair, Y.R.; Rhoads, R.P.; Ueki, I.; Wang, J.; Ooi, G.T. The acid-labile subunit (ALS) of the 150 kDa IGF-binding protein complex: An important but forgotten component of the circulating IGF system. *J. Endocrinol.* **2001**, *170*, 63–70. [CrossRef] [PubMed]
46. Guler, H.P.; Zapf, J.; Schmid, C.; Froesch, E.R. Insulin-like growth factors I and II in healthy man. Estimations of half-lives and production rates. *Acta Endocrinol.* **1989**, *121*, 753–758. [PubMed]
47. Gilmore, J.H. NIH Public Access. *AJNR Am. J. Neuroradiol.* **2008**, *29*, 1883–1889. [CrossRef]
48. Charlesworth, J.A.; Timmermans, V.; Golding, J.; Campbell, L.V.; Peake, P.W.; Pussell, B.A.; Wakefield, D.; Howard, N. The complement system in Type 1 (insulin-dependent) diabetes. *Diabetologia* **1987**, *30*, 372–379. [CrossRef] [PubMed]
49. Jenhani, F.; Bardi, R.; Gorgi, Y.; Ayed, K.; Jeddi, M. C4 polymorphism in multiplex families with insulin dependent diabetes in the Tunisian population: Standard C4 typing methods and RFLP analysis. *J. Autoimmun.* **1992**, *5*, 149–160. [CrossRef]
50. Szilagyi, A.; Blasko, B.; Szilassy, D.; Fust, G.; Sasvari-szekely, M.; Ronai, Z. Real-time PCR quantification of human complement C4A and C4B genes. *BMC Genet.* **2006**, *7*, 1–9. [CrossRef] [PubMed]
51. Wang, H.; Tian, Y.; Chien, C.; Kan, W.; Liao, P.; Wu, H.; Su, S.; Lin, C. Differential proteomic characterization between normal peritoneal fluid and diabetic peritoneal dialysate. *Nephrol. Dial. Transpl.* **2010**, *25*, 1955–1963. [CrossRef] [PubMed]
52. Lappas, M. Lower circulating levels of complement split proteins C3a and C4a in maternal plasma of women with gestational diabetes mellitus. *Diabet. Med.* **2011**, *28*, 906–911. [CrossRef] [PubMed]
53. Kingery, S.E.; Wu, Y.L.; Zhou, B.; Hoffman, R.P.; Yu, C.Y. Gene Copy-Number Variations (CNVs) and Protein Levels of Complement C4A and C4B as Novel Biomarkers for Partial Disease Remissions in New-Onset Type 1 Diabetes Patients. *Pediatr. Diabetes* **2012**, *13*, 408–418. [CrossRef] [PubMed]
54. Lintner, K.E.; Wu, Y.L.; Yang, Y.; Spencer, C.H.; Hauptmann, G.; Hebert, L.A.; Atkinson, J.P.; Yu, C.Y. Early components of the complement classical activation pathway in human systemic autoimmune diseases. *Front. Immunol.* **2016**, *7*, 1–22. [CrossRef] [PubMed]
55. Nityanand, S.; Hamsten, A.; Lithell, H.; Holm, G.; Lefvert, A.K. C4 null alleles and myocardial infarction. *Atherosclerosis* **1999**, *143*, 377–381. [CrossRef]
56. Thorens, B. GLUT2, glucose sensing and glucose homeostasis. *Diabetologia* **2014**, *58*, 221–232. [CrossRef] [PubMed]
57. Gould, G.W.; Holman, G.D. The glucose transporter family: Structure, function and tissue-specific expression. *Biochem. J.* **1993**, *295*, 329–341. [CrossRef] [PubMed]
58. Bell, G.I.; Kayano, T.; Buse, J.B.; Burant, C.F.; Takeda, J.; Lin, D.; Fukumoto, H.; Seino, S. Molecular biology of mammalian glucose transporters. *Diabetes Care* **1990**, *13*, 198–208. [CrossRef] [PubMed]
59. Liu, G.J.; Simpson, A.M.; Swan, M.A.; Tao, C.; Tuch, B.E.; Crawford, R.M.; Jovanovic, A.; Martin, D.K. ATP-sensitive potassium channels induced in liver cells after transfection with insulin cDNA and the GLUT2 transporter regulate glucose-stimulated insulin secretion. *FASEB J.* **2003**, *17*, 1682–1684. [CrossRef] [PubMed]
60. Tobin, V.; Le Gall, M.; Fioramonti, X.; Stolarczyk, E.; Blazquez, A.G.; Klein, C.; Prigent, M.; Serradas, P.; Cuif, M.H.; Magnan, C.; et al. Insulin internalizes GLUT2 in the enterocytes of healthy but not insulin-resistant mice. *Diabetes* **2008**, *57*, 555–562. [CrossRef] [PubMed]

61. Yamashita, Y.; Yamaoka, M.; Hasunuma, T.; Ashida, H.; Yoshida, K.I. Detection of orally administered inositol stereoisomers in mouse blood plasma and their effects on translocation of glucose transporter 4 in skeletal muscle cells. *J. Agric. Food Chem.* **2013**, *61*, 4850–4854. [CrossRef] [PubMed]
62. Stewart, A.F.S.A.; Wang, P.; Fiaschi-Taesch, N.M.; Vasavada, R.C.; Scott, D.K.; García-Ocaña, A.; Stewart, A.F. Diabetes mellitus—Advances and challenges in human β cell proliferation. *Nat. Rev. Endocrinol.* **2015**, *11*, 201–212. [CrossRef]



© 2018 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Material Suplementario

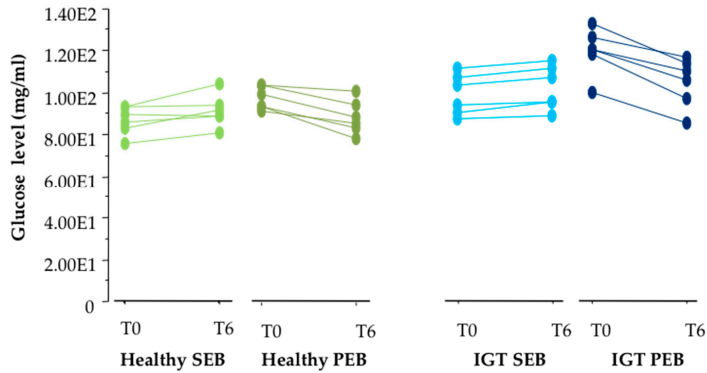


Figure S1. Cell line chart showing the individual glucose change of each subject after 6 weeks of PEB or SEB supplementation.

Table S1. Sugars characterization [1,2].

Product	Relative Sweetness *	Kcalories/g
Pinitol	50%	2.5 Kcal/g
Sucrose	100%	3.9 Kcal/g
Fructose	150%	3.7 Kcal/g
Glucose	40%	3.8 Kcal/g

* Taking sucrose as 100% of sweetness.

Table S2. Changes in the proteomic profile after SEB intake.

	Healthy Subjects			IGT Subjects		
	T0	T6	Δ%	T0	T6	Δ%
C4A alpha	6.2 ± 0.8	8.9 ± 1.6	44.6	12.5 ± 1.6	12.0 ± 2.0	-4.0
C4A gamma	47.2 ± 12.4	56.2 ± 10.2	19.2	59.6 ± 7.0	48.3 ± 16.3	-19.1
C4A Total	53.4 ± 12.3	65.2 ± 10.2	22.1	72.2 ± 7.5	60.3 ± 16.3	-16.4
IGFBP1-ALS	31.3 ± 3.7	55.9 ± 25.2	78.5	36.9 ± 2.4	40.4 ± 1.9	9.4

*Data expressed as mean value $\times 10^4 \pm$ SEM. No significance was observed either in the healthy group or in the IGT group after the intake of a sucrose-enriched beverage.

[1] Dinicola, S.; Minini, M.; Unfer, V.; Verna, R.; Cucina, A.; Bizzarri, M. Nutritional and acquired deficiencies in inositol bioavailability. Correlations with metabolic disorders. *Int. J. Mol. Sci.* 2017, 18.

[2] Aeberli, I.; Hochuli, M.; Gerber, P. A.; Sze, L.; Murer, S. B.; Tappy, L.; Spinaz, G. A.; Berneis, K. Moderate amounts of fructose consumption impair insulin sensitivity in healthy young men: A randomized controlled trial. *Diabetes Care* 2013, 36, 150–156, DOI:10.2337/dc12-0540.

ARTÍCULO 3

“Stem cells from cardiac adipose tissue depots show different gene expression and functional capacities”

Carmen Lambert¹, Gemma Arderiu¹, Maria Teresa Bejar¹, Javier Crespo¹, Maribel Baldellou¹, Oriol Juan-Babot¹, Lina Badimon^{1,2,3,§}.

¹ Cardiovascular-Program ICCC, IR-Hospital Santa Creu I Sant Pau, IIB Sant Pau, Barcelona

² Ciber CV, 28029 Madrid, Spain

³ Cardiovascular Research Chair UAB; Barcelona, Spain.

En revisión en: Stem Cell Research & Therapy (SCRT-D-19-00613)

Factor de impacto (2018): 4.963

RESUMEN:

Las células madre del tejido adiposo cardiaco presentan diferente expresión génica y capacidades funcionales dependiendo de su localización.

La composición y función del tejido adiposo que cubre el corazón es poco conocida. En este estudio, hemos investigado el tejido adiposo epicárdico que cubre el miocardio en el ápex y el tejido adiposo que cubre el surco LAD en el corazón humano, para así identificar la actividad funcional como depósito de células madre. Para ello, e aisló tejido adiposo epicárdico del área que cubre el músculo miocárdico en el ápex (VMAT) y del área que cubre el surco arterial epicárdico de la LAD (PVAT) en corazones humanos extraídos durante la cirugía de trasplante de corazón. Las células madre adiposas (ASCs) de ambos depósitos de tejido adiposo se aislaron inmediatamente y se caracterizaron fenotípicamente mediante citometría de flujo. Los

RESULTADOS

diferentes comportamientos de estas ASC y sus microvesículas liberadas (MVs) se analizaron mediante análisis molecular y celular. Las ASC tanto del VMAT (mASC) como del PVAT (pASC) se caracterizaron por la expresión de los marcadores de superficie CD105, CD44, CD29, CD90 y CD73. Los genes relacionados con el proceso de angiogénesis VEGFA, COL18A1 y TF, así como el miRNA126-3p y miRNA145-5p se analizaron en las ASC de ambas localizaciones. Ambas ASC fueron capaces de formar estructuras tubulares en superficies tridimensionales de matrigel. Por otro lado, las pASCs mostraron un mayor nivel de expresión de VEGFA y menor de COL18A1 que las mASCs, sugiriendo una mayor activación de la vía del VEGF en las ASC perivasculares. Además, las MV extracelulares liberadas por las mASCs, indujeron una mayor cicatrización de las heridas producidas en células endoteliales microvasculares humanas. En este estudio se demuestra por primera vez que las ASCs residentes en el tejido adiposo epicárdico humano, muestran una función angiogénica específica del depósito. Además, hemos demostrado que las células madre residentes pueden regular la función de las células endoteliales mediante la liberación de microvesículas y otras partículas extracelulares.

Stem cells from human cardiac adipose tissue depots show different gene expression and functional capacities

By

Carmen Lambert¹, Gemma Arderiu^{1,§}, Maria Teresa Bejar¹, Javier Crespo¹, Maribel Baldellou¹, Oriol Juan-Babot¹, Lina Badimon^{1,2,3,§}.

From

¹Cardiovascular-Program ICCC, IR-Hospital Santa Creu I Sant Pau, IIB Sant Pau, Barcelona; ²Ciber CV, 28029 Madrid, Spain ³Cardiovascular Research Chair UAB; Barcelona, Spain.

Total Word Count: 7813

Abstract Word Count: 265

Total Tables / Figures: 1 Table (+ 2 S. Tables) / 5 Figures (+ 4 S. Figures)

Sources of Support: This work was supported by grants from the Spanish Ministry of Science, Innovation and Universities [SAF2016-76819-R to L.B.]; Institute of Health Carlos III, ISCIII TERCEL RD16/00110018; and CB16/11/0041 to L.B. and P17/01321 to GA; FEDER "Una Manera de Hacer Europa"; the Secretary of University and Research, Department of Economy and Knowledge of the Government of Catalonia [2017SGR1480]; and "CERCA Programme/Generalitat de Catalunya" Spain. We thank FIC-Fundacion Jesús Serra, Barcelona, Spain, for their continuous support.

§Correspondence to:

Dr. Gemma Arderiu
Cardiovascular Program IR-Hospital Santa Creu I Sant Pau, IIB Sant Pau
C/Sant Antoni M^a Claret 167, 08025 Barcelona, Spain.
Phone: (34) 935565880. Fax: (34) 935565559.
garderiu@santpau.cat

Prof. Lina Badimon
Cardiovascular Program IR-Hospital Santa Creu I Sant Pau, IIB Sant Pau
C/Sant Antoni M^a Claret 167, 08025 Barcelona, Spain.
Phone: (34) 935565880. Fax: (34) 935565559.
lbadimon@santpau.cat

Abstract

Background: The composition and function of the adipose tissue covering the heart is poorly known. In this study we have investigated the epicardial adipose tissue (EAT) covering the cardiac ventricular muscle and the EAT covering the left anterior descending artery (LAD) on the human heart, to identify their resident stem cell functional activity.

Methods: EAT covering the cardiac ventricular muscle was isolated from the apex (avoiding areas irrigated by major vessels) of the heart (ventricular myocardium adipose tissue, VMAT) and from the area covering the epicardial arterial sulcus of the LAD (PVAT) in human hearts excised during heart transplant surgery. Adipose stem cells (ASCs) from both adipose tissue depots were immediately isolated and phenotypically characterized by flow cytometry. The different behavior of these ASCs and their released secretome-microvesicles (MVs) were investigated by molecular and cellular analysis.

Results: ASCs from both VMAT (mASCs) and the PVAT (pASCs) were characterized by the expression of CD105, CD44, CD29, CD90 and CD73. The angiogenic-related genes VEGFA, COL18A1 and TF, as well as the miRNA126-3p and miRNA145-5p were analyzed in both ASCs types. Both ASCs were functionally able to form tube-like structures in three dimensional basement membrane substrates. Interestingly pASCs showed higher level of expression of VEGFA and reduced level of COL18A1 than mASCs. Furthermore, MVs released by mASCs, significantly induced human microvascular endothelial cell migration.

Conclusion: Our study indicates for the first time that the resident ASCs in human epicardial adipose tissue display a depot specific angiogenic function. Additionally, we have demonstrated that resident stem cells are able to regulate microvascular endothelial cell function by the release of MVs.

Key Words. Epicardial adipose tissue. Perivascular adipose tissue. Ventricular myocardium adipose tissue. Adipose stem cells. Microvesicles. Angiogenesis.

Background

Cardiovascular diseases (CVDs) are the leading cause of death and disability worldwide, and coronary artery disease makes up the greatest proportion of those deaths. Acute myocardial infarction leads to an irreversible loss of proper cardiac function; implantation of adult stem cells into the ischemic damaged myocardium has been investigated for its potential to repair/regenerate the injured tissue within the infarct zone [1–4].

Adipose tissue (AT) has long been considered an energy storage and endocrine organ. However, in the last decades, adipose tissue has also been considered a rich source of mesenchymal cells and is currently the focus of interest in the field of inducible spontaneous regeneration and cell therapy. Adipose-derived stem cells (ASCs) are easily obtained, show a strong capacity for ex vivo expansion and differentiation to other cell types (as cardiomyocytes [5] or endothelial cells [6,7]) release a large variety of angiogenic factors, and have immunomodulatory properties. All these properties have encouraged its use to induce ischemic tissue recovery. However, their clinical use of bone marrow stem cells has been hampered by the recognition of loss of function effects of ageing, cardiovascular risk factors (CVRFs) and metabolic disorders [8]. Indeed, regarding spontaneous endogenous repair, our group has shown that the presence of CVRFs, as type 2 diabetes mellitus, negatively affects the pluripotency and self-renewal capacities of adipose stem cells (ASCs) [9], and as well ASCs obtained from obese patients display an impaired angiogenic potential [10,11]. Indeed, the spontaneous regenerative capacity for ASCs self-renewal seems to be regulated by the anatomical WAT depot.

Beside the commonly known CVRFs that are known to elevate the risk of suffering CVDs, excess adiposity is considered a CVRF for CVD [12]. The relationship between obesity and the development of any CVDs lies not only in the amount of fat, but also in its localization. AT is highly heterogeneous tissue due to its different types (white, brown, and 'brite') and its different body localizations (subcutaneous, visceral, epicardial, and perivascular, etc.). Composition, structure, and function of adipose tissue are highly dependent on individual metabolic factors that we are still learning. Ectopic AT covering different organs may have different anatomic and functional characteristics, and due to its proximity to various internal organs may exert organ-specific regulatory functions [13].

AT that directly surrounds the heart is known as epicardial adipose tissue (EAT). EAT, a thoracic fat depot that exists on the surface of the myocardium and is contained entirely beneath the pericardium, has acquired increasing interest because of its

proximity to the myocardium and coronary arteries and their branches [12]. EAT has been reported to exert an endocrine role by deregulation of adipokine secretion [14,15], and to have direct effects on local inflammation and coronary atherosclerosis [16–18]. EAT is also a source of ASCs and it has been reported that these cells may have a higher cardiomyogenic potential as compared to pericardial and omental ASCs subtypes [19].

ASCs not only have interest for their capacity to differentiate into differentiated cells, as cardiomyocytes, but also for their capacity to stimulate angiogenesis promoting progenitor cell differentiation and paracrine proangiogenic and immunomodulatory effects [20]. The proangiogenic effects of conditioned medium derived from ASCs supports this paracrine view of stem cells function [4]. Previous studies indicated that microvesicles (MVs) released by ASCs mediate their proangiogenic effects by cell-to-cell communication stimulating formation and stabilization of vessel formation [21]. However, little is known about epicardial ASCs, in particular those located closely to the vessels [AT around vessels is known as perivascular AT (PVAT)] and those resident in the EAT directly superimposed on the cardiac muscle (VMAT) covering the apex of the heart. The contribution to these two stem cell reservoirs to cardiac cell function and to cardiac endogenous repair processes after ischemic injury is unknown. As the coronary arteries and their major branches are imbedded in PVAT, this creates a perfect environment for the local interaction between ASCs present in this fat and the coronary vessels it surrounds. Angiogenesis is essential for repair of wounded or ischemic organs, and insufficient angiogenic switch in ischemic heart can limit revascularization, healing, and regeneration [22].

Here, we hypothesized that EAT from two different locations in the human heart may contain a repository of stem cells (ASCs) with different pro-angiogenic functions.

Materials and Methods

Sample collection/ Patients

VMAT and PVAT were obtained from the excised hearts of 30 patients undergoing cardiac transplant surgery at the Hospital de Sant Pau i la Santa Creu (**Table 1**). Only samples from three patients were excluded, two of them due to internal cell contamination and the other one due to an endocarditis. Tissue was obtained with informed consent of patients. The protocol was approved by the Research Ethics Committee of our hospital and was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki. Patients until the moment of transplant surgery were treated as recommended by clinical practice guidelines. Left anterior descending (LAD) coronary arteries were collected and PVAT isolation. Arteries were fixed in 4% paraformaldehyde and stored at -80°C embedded in OCT until histological analysis.

Simultaneously epicardial adipose tissue directly overlying the ventricular myocardium at the apex of the heart (VMAT) was collected. All studies were run in parallel with samples from both locations from the same patients. Both VMAT and PVAT were carefully dissected, and frozen in liquid N₂ and kept at -80°C until used or placed in tubes with 10ml of Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Gibco, Life Technologies, Grand Island, NY, USA) supplemented with 1% penicillin/streptomycin (P/S, Gibco, Life Technologies, Grand Island, NY, USA) to be immediately processed to isolate ASCs.

ASCs isolation and characterization

PVAT and VMAT tissues were washed with sterile phosphate buffered saline (PBS) supplemented with 1% of P/S. Tissue was digested into a type I collagenase solution (1 mg/ml; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and incubated for 1 hour in a 37°C pre-warmed orbital shaker. Collagenase activity was neutralized with the same amount of fetal bovine serum (FBS; Biological Industries, Kibbutz Beit-Haemek, Israel) and the suspension filtered through a 100µm strainer to eliminate remaining tissue fragments. Then, the suspension was centrifuged at 1200 rpm for 10 min to separate the adipocytes and to obtain the stromal vascular fraction (SVF). Isolated SVF cells were counted and separated into two aliquots to be analyzed by flow cytometry and to be plated onto a 25-cm² culture flasks. After twenty-four hours, non-adherent cells were removed and the medium replaced. Cells were expanded in a humidified environment at 37°C with 1% O₂, 5% CO₂ and maintained at sub-confluent levels prior to phenotypic profile analysis. The cells were characterized as stem cells 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 4. A simplified scheme of the procedure is shown in the **Figure 1A**.

For cell cytometry characterization, cell surface antigen phenotyping was performed on SVF and ASCs obtained from SVF at passage 3 (P3). The following cell-surface epitopes were marked with anti-human antibodies: CD105, CD44, CD29, CD90, CD73, CD45 and CD14. Cells (1×10^5) at passage 3 or 1 mL of the SVF were suspended in flow cytometry buffer (PBS, 0.1% BSA, 0.1% sodium azide) and incubated for 30 min at 4°C with the corresponding antibodies. After that, reaction was stopped by adding 500 μ L of flow cytometry buffer or 250 μ L of Quicklysis reagent (Cytognos) in the case of the SVF. Quicklysis was incubated for 15 min at room temperature to eliminate erythrocytes and the reaction was stopped by adding 250 μ L of flow cytometry buffer. Cellular events (at least 30000 in the case of ASCs and between 10000 and 60000 in the case of the SVF) were acquired and analysed by Fluorescence-activated cell sorting using Coulter EPICS XL flow cytometer (Beckman Coulter) running Expo32 ADC XL 4 colour software (Beckman Coulter).

Adipogenic and osteogenic differentiation was also evaluated for further characterization as previously described [11]. Briefly, cells were seeded in 6-wells and 24-wells plates for the differentiation assay and for RNA isolation or cell staining respectively. Cells were allowed to growth to sub-confluence (approximately 80% of confluence) and then allowed to differentiate during 21 days with the corresponding conditional medium or normal medium without supplements as a negative control (**Supplementary table 1**). After 21 days, RNA from the differentiated cells was isolated and also cells were stained with oil-red to detect adipogenic differentiation and Alizarin red to detect osteogenic differentiation.

Growth kinetics of ASCs

To determine the growth kinetics of ASCs, 2×10^4 cells per well were seeded in ten wells of 6-well plates. Cells from 2 duplicate wells were harvested and counted every other day during 10 days (cells were counted on days 2, 4, 6 and 10). ASCs number was plotted against the number of days cultured. Population doubling time (PDT) was calculated using the formula $PDT = T_e / [(\log N_2 - \log N_1) / \log 2]$, where T_e is time (days) in the exponential-growth phase, N_1 is the number of cells at the beginning, and N_2 is the number of cells at the end of the experiment.

MTS viability/proliferation analysis

Cell 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). For this assay, 15×10^3 of ASCs or 1×10^4 human microvascular endothelial cells (HMEC-1) were seeded in triplicates into 96-well plate. ASCs were cultured for 24 hours and then treated with 10 μ l of MTS. HMEC-1 were cultured for 24 hours, then treated with ASCs derived MVs for other 24 hours, and finally, 10 μ l of MTS per well were added and incubated for additional 2 hours, while MTS tetrazolium is reduced to formazan (490 nm absorbance) by the metabolically active cells. The absorbance was then quantified with the spectrophotometer Spectramax 250 and analysed with the SoftMax software (Molecular Devices). Formazan production was directly related with the number of cells alive in the culture.

Tube-like formation assay

Tube-like formation assay in three dimensional basement membrane culture was employed to assess the angiogenic potential of ASCs. Briefly, 1×10^5 cells were seeded in a matrigel coated plate and incubated with endothelial cell growth medium (EGM-2 BulletKit, Lonza, USA) for 24h to allow the formation of tube-like structures. Total tube-covered area was quantified using Image J software (National Institutes of Health, USA).

ASCs conditioned medium collection

Cells at passage 3 or 4 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 48h, the ASCs conditioned medium was collected and centrifuged at 1200 rpm for 10 min to remove cellular debris and kept at -80°C until used.

Microvesicles isolation

ASCs derived microvesicles (MVs) were isolated by ultracentrifugation of P3 cell supernatants as previously described [23]. Briefly, fresh supernatants were firstly centrifuged at 900 g for 15 minutes to eliminate cell debris and then at 20,000 g for 45 minutes to isolate the MVs as a pellet. MVs concentration was determined by flow cytometry. For that, MVs were washed with a PBS-citrate buffer and centrifuged again at 20,000 g for 30 minutes. MVs were extracted with PBS-citrate buffer and incubated

RESULTADOS

with Annexin V (CF Blue ANXV, Immunostep) and anti-TF antibody (FITC conjugated 4508CJ, Sekisui). Samples were then diluted with Annexin V binding buffer (BD Bioscience) to stop the reaction and then analyzed on a FACSCantoll™ flow cytometer (BD Bioscience). The formation of MVs after cell activation is initiated by increase of intracellular calcium resulting in an elementary rearrangement of the phospholipid asymmetry with translocation of phosphatidyl-serine from the inner to the outer surface leaflet of the plasma membrane as a consequence of activation of scramblase and floppase/ABC1 and inhibition of translocase/flippase activities. Presence of phosphatidylserine at the surface of the MPs membrane enables the use of the AnnexinV for MVs detection by flow cytometry. MVs gate limits were established following two criteria: 1) calibration using a Flow-Check Size Range Calibration Kit (Polysciences) and 2) using an in vitro platelet-derived microparticle population as positive control. The lower detection limit was placed as a threshold above the electronic noise of our flow cytometer.

Cell Migration

HMEC-1 were used for the cell migration assays. Briefly, 2.3×10^4 eASCs were seeded into 100mm dish and cultured with MCDB 131 medium supplemented with 10% of FBS for 48h to allow cells to secrete MVs. The day after, 2.5×10^5 HMEC-1 cells were seeded into a Culture-Insert 2 well dish (Idibi) and kept with MCDB 131 supplemented with 10% of FBS overnight. MVs from the eASCs supernatant (eMV) were isolated and before performing the experiment, the insert was removed by using sterile tweezers and the dish washed with PBS to remove cell debris. Cells were treated with 600 μ l of: A) Conditional medium from ASCs after 48h of culture; B) Conditional medium from ASCs without eMV after 48h of culture; and C) eMV enriched medium after 48 of culture. In all conditions medium was supplemented with 2% of FBS. Cell migration and wound repair were controlled every two hours for 10h. Wound areas were analyzed by using Image J software. Protein, RNA and microRNA were isolated from the ASCs, microRNA from the eMV and RNA and microRNA from the HMEC-1 cells after 24 hours of cell migration.

Gene expression analysis

Total RNA was isolated from ASCs in silica-membrane columns with the Qiagen RNesasy Mini Kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions.

MirVana miRNA isolation kit (Life Technologies) was used to extract microRNA from the cells, and miRNeasy Serum/Plasma Kit for the microRNA isolation from MVs, according to the manufacturer's instruction.

RNA and microRNA quantity was determined with Nanodrop ND-1000 spectrophotometer (Nanodrop Technologies). Isolated total RNA was reverse-transcribed into cDNA using High Capacity cDNA Archive kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), and microRNA with the TaqMan advanced miRNA assay (Life Technologies). Gene expression analysis was carried out by quantitative PCR using TaqMan® Gene Expression assays (Applied Biosystems; **Supplementary table 2**), 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 the correspondent housekeeping gene expression.

Western Blot analysis

Protein was extracted from total cell lysates by using RIPA buffer (50 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% sodium Deoxycholate, 0.1% SDS) or from 48 hours cell supernatant. Protein concentrations were measured with Pierce BCA Protein Assay Kit (ThermoScientific). Twenty-five micrograms of protein were resolved by 1-DE under reducing conditions onto 10% SDS-PAGE gels and electrotransferred to nitrocellulose membranes. After blocking for non-specific binding with 5% of Bovine Serum Albumin (BSA; MP Biomedical) or Blotto, membranes were incubated with primary antibodies, including TF (4501-Sekisui Diagnostics), Endostatin (ab109660-abcam) and VEGF (ab51745-abcam). Band detection was performed using a chemiluminiscent substrate dye (SuperSignal® West Dura Extended Duration Substrate, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) and a molecular imager ChemiDoc XRS System, Universal Hood II (BioRad, Hercules, CA, USA). Band quantification was performed with Image Lab 4.0 software (BioRad laboratories, Hercules, CA, USA). Protein load was normalized with total protein staining, and normalization between different membranes was performed with a common pool in every gel, as previously described [24].

Statistical analysis

Non-parametric Wilcoxon or Mann-Whitney analyses were performed to analyze differences between tissues. Data are expressed as mean \pm SEM unless stated. The

RESULTADOS

level of significance was set at $p < 0.05$. All analyses were conducted with StatView software.

Results

Sample characterization

Heart adipose tissue and LAD coronary arteries were collected at the operating room during heart transplantation surgery. LAD coronary arteries were classified according to the AHA classification from intimal thickening (IT) to type VI and total occlusion (TO) (**S. Figure 2A-H**). ASCs were isolated immediately after tissue dissection, harvested and characterized by their adherence to plastic, their ability to differentiate into multiple cell lineages and the expression of different cell surface markers. ASCs were positive to CD29, CD44, CD73, CD90 and CD105, characteristic mesenchymal stem cells surface markers and negative for the hematopoietic marker CD45 and the monocyte marker CD14 (**Figure 2A**). These results show that the adipose tissue covering the human heart is a repository for stem cells.

Proliferation and viability of ASCs from the different adipose tissue depots

The proliferative rate of ASCs obtained from VMAT (mASCs) was always higher than that ASCs obtained from PVAT (pASCs) (**Figure 2B**), however, the main change was observed during the first 4 days, thus, the calculated doubling time of mASCs and pASCs was almost the same during the days 6 and 8 (**Figure 2C**). Interestingly, the cellular viability MTS assay demonstrated a significantly higher viability in mASCs than in pASCs ($P=0.001$; **Figure 2D**) after 24 hours in culture.

In vitro angiogenic related gene expression of apex EAT and PVAT derived ASCs

In order to evaluate the angiogenic potential of mASCs and pASCs different angiogenic related genes were measured. pASCs showed a significantly higher mRNA expression of VEGFA compared with apex derived ASCs ($N=15$; $P=0.04$; **Figure 3A**), and a significant reduced mRNA level of COL18a1 ($N=15$; $P=0.02$; **Figure 3B**). Instead pASCs and mASCs showed similar mRNA expression levels of TF ($N=12$; $P=0.24$; **Figure 3C**), FGF2 ($N=6$; $P=0.46$; **Figure 3D**) and TIE2 ($N=7$; $P=0.31$; **Figure 3E**).

Protein levels of TF and endostatin were also measured by western Blot and a non-significative higher level of TF on pASC compared to mASC ($P=0.093$; **S. Figure 2A**) was observed. Endostatin levels were measured both in cells and secretome, but no differences were observed between tissues (**S. Figure 2B-C**).

Ability of both ASCs to form tube-like structures was investigated. Both mASCs and pASCs had similar capacity to induce tube-like formation in matrigel cultures (**S. Figure 3A and 3B**, $N=9$; $P=0.21$). The ability to form tubes by pASCs derived from LADs with mild atherosclerosis ($N=4$; IT to grade III) and pASCs derived from LAD with severe

atherosclerosis (N=5; grade IV occlusion to TO) was not significantly different (**S. Figure 3C**)

Effect of obesity and diabetes on eASCs released microvesicle function

Because of the impact of obesity in adipose tissue accumulation and fat characteristics, we investigated whether mASCs derived microvesicles (mMVs) could exert a regulatory effect on human microvascular endothelial cell proliferation. First, we observed that mASCs from obese non-diabetic patients release less mMVs than those ASCs from obese diabetic patients (P=0.06; **Figure 4A**). Interestingly, obese and diabetic mASCs-released mMVs have significantly higher levels of Annexin V than those released by non-obese non-diabetic patients (P=0.03; **Figure 4A**). Annexin V binds to phosphatidylserine that is usually exposed in the outer leaflet of the plasma membrane of cells that are activated or apoptotic and released in the microvesicles. Next, we analyzed whether these MVs were also positive for TF, because previous studies in our group have described that TF rich microvesicles increase angiogenesis in ischemic tissue [25]. The mMVs from mASCs of non-obese and non-diabetic patients (total or Annexin V positive) contain significantly higher TF amount than those of mASCs from obese non-diabetic patients (P=0.004 and P=0.02 respectively; **Figure 4A**). mMVs from mASCs of obese non-diabetic patients also contain less TF than mMVs from mASCs of obese diabetic patients (P=0.02; **Figure 4A**).

We then analyzed the microRNA (miRNA) composition of those eMVs. We analyzed two different miRNA that have been implicated in ASCs and the angiogenic process as miRNA 126-3p and miRNA 145-5p [26,27]. We found that mMVs from mASCs of non-obese non-diabetic patients had significantly higher content of miRNA 126-3p than those mMVs from mASCs of obese diabetic patients (P=0.05; **Figure 4B**). Non-significant change was observed on miRNA 145-5p (**Figure 4C**).

To evidence the effects of mASCs secreted mMVs on human microvascular endothelial cells function, we first performed a MTS viability assay and no significant effects on cell viability after treatment with mMVs was observed, however HMEC cells treated with mMVs from non obese non diabetic patients showed a non significant improvement on HMEC viability (**S. Figure 4A**).

The effect of mASCs secreted mMVs on HMEC-1 migration showed that, after 10 hours of incubation, those wounds treated with mMVs-free secretome were significantly less able to repair the wounded area compared with those treated with mMVs rich medium (P=0.05; **Figure 4D**), with the highest effect seen when HMEC-1 cells were treated with mMVs released by mASC from obese diabetic patients (**S. Figure 4B-D**).

To evidence the effect of mMVs on receptor HMEC-1 cells we analyzed the mRNAs and the miRNAs expressions in the receptor cells that had been incubated with the supernatants of EAT-ASCs. We observed no change on TF expression (**Figure 5A**) nor in miRNA 126-3p (**Figure 5C**) and miRNA 145-5p (**Figure 5D**), but a significant increase on VEGFA (**Figure 5B**) expression induced by both total CM (P=0.01) and mMVs free medium (P=0.01), implying effects independent of MVs but associated to soluble factors.

These results indicate that obesity and diabetes impact on the pro-angiogenic capacity of resident stem cells and explain the low spontaneous regenerative efficacy of stem cells in patients with metabolic syndromes.

Discussion

The EAT has emerged as a depot with a distinctive biological significance in cardiac function. Moreover, it is a reservoir of ASCs, with yet undefined effects on the potential regeneration of ischemic tissue. Here, we show that ASCs contained in different EAT locations obtained from patients with advanced heart failure requiring transplant have distinct functional properties.

The relationship of the adipose tissue with CVD has been widely studied [28,29]. Around 80% of the heart is covered by visceral ectopic adipose tissue depots, which in lean subjects is considered cardioprotective because of the secretion of anti-inflammatory and anti-atherogenic adipokines. However, an excess and thickness of fat around the heart, usually measured by imaging techniques, has been associated to CVD [16,30]. Although imaging has brought a growing interest on the presence of heart EAT, it has not been possible to functionally study this adipose tissue as widely as it has been done with other more accessible depots [31].

The ectopic visceral adipose tissue covering the heart can be sub-classified by location, as perivascular fat and fat directly overlying the myocardium, with blood supplies directly derived from the coronary arteries and their branches [32,33]. The function of the stem cells found in these adipose tissue depots has not been studied in-depth. This study has focused on the identification, isolation and comparison, for the first time, of the ASCs covering the LAD (PVAT) and the ASCs covering the ventricular myocardium at the apex (VMAT) of hearts explanted during heart transplant operations. These ASCs were characterized by their adherence to plastic as well as by the expression of different stem cell markers (CD90, CD105, CD44, CD29 and CD73) and the absence of the leukocyte marker CD45 and the innate immune system marker CD14. Thus, both fat locations have a significant amount of resident stem cells.

We have observed that mASCs have a higher proliferative rate and growth kinetics than pASC, which might suggest that mASCs are cells with an active participation in local regenerative activity and homeostasis. Due to the angiogenic activity of adipose tissue [34], we investigated the genomic angiogenic-profile of these cells. Even though there are many proteins involved in the angiogenic process, VEGF is undoubtedly the most important angiogenic factor. It is a potent mitogen for endothelial cells (ECs), involved both in the development of the vascular system and the induction and maintenance of the neovasculature in tumors. VEGF binds to any of the tyrosine kinase receptors (VEGFR1 or VEGFR2), which induce the phosphorylation of the tyrosine

residues, thus activating intracellular signaling pathways involved in EC proliferation, migration and survival [35,36]. On the other hand, COL18A1 is a gene that encodes the anti-angiogenic protein endostatin in its C-Terminal domain [37]. Endostatin inhibits EC proliferation and migration and induces EC apoptosis by the blocking the binding of VEGF with the tyrosine receptor KDR (VEGFR-2) [38]. We found that pASCs, express a higher amount of VEGFA, as well as a reduced expression of COL18A1, compared with the mASCs, suggesting a coordinated regulation of angiogenesis through these two proteins by EAT derived ASCs, which is increased on pASC, in direct contact with the LAD compared with mASC. By contrast, no differences by location were achieved in other genes as TF, TIE2 and FGF-2. The role of these genes in angiogenesis is well established [39–41]; in fact, FGF-2 induce the formation of new capillary like tubules on HMEC cells [42]. However, in line with our results, in previous studies no differences were observed when comparing the expression of FGF-2 in ASC from different sources, but changes on this proteins were obtained as a result of the age of the donor [43]. TIE-2 is related with the ANGPT system [44]; thus, a deep study on this pathway is needed for the better understanding of this new source of epicardial ASC.

Few studies have analyzed the presence and function of heart adipose tissue-derived stem cells, neither in animal [45,46] nor in human [19] models, and in none of them their angiogenic potential has been analyzed and compared. Previous studies in our group have showed how ASCs derived from the subcutaneous adipose tissue, independently of the BMI, have no ability to form tubes in a matrigel-based experiment [11], but here we demonstrate for the first time, that both mASCs and pASCs, when seeded in a 3D matrigel surface and cultured with EGM-2 medium, are able to form capillary-like ring structures, independently of cardiac fat location and of atherosclerosis severity in the LAD indicating a proangiogenic function. More studies are needed to analyze the influence of different co-morbidities on heart adipose tissue and its derived ASC.

Angiogenesis is mediated not only by VEGFA [47] and COL18A1 [48], but also by many other genes, such as fibroblast growth factor (FGF), angiopoietin I and II (ANGPT I-II) [41] and NOTCH [49] among others, and target cells include endothelial cells (EC) and vascular smooth muscle cells (VSMCs) [50,51] were involved.

In fact, a coordinated reaction between different cellular types and metabolic factors is needed for the correct development the angiogenic process [52]. It would also be of great interest to analyze the adipokines secreted by these EATs and resident ASCs to further characterize both epicardial heart depots and their potential implication on myocardial self-regeneration.

Spontaneous regeneration of damage tissue may be accomplished not only by ASCs differentiation and also by ASC-released microvesicles (MVs) and exosomes [53,54]. MVs are small particles with a diameter ranging from 0.10 to 1.00 μm released by many cell types, including ASCs [55]. The potential of MVs released by ASCs to improve HUVEC migration, proliferation and angiogenesis has been reported [56,57]. Many studies support the concept of a proangiogenic effect of MVs depend on their composition, conferring to them a dynamic storage pool of bioactive molecules that play essential roles in cell-cell cross talk. In this way, MVs can provide intercellular communication by delivery of miRNAs to influence transcription and altering genetic processes. miRNA126-3p is one of the more important miRNAs in angiogenesis [58], and it has been described to be present in MVs. In line with these results, we have also demonstrate that heart mASCs from non-obese and non-diabetic heart failure patients release mMVs, rich in miRNA126-3p, that improve microvascular endothelial cells (HMEC-1) viability and are more effective than mASCs conditioned medium (CM), or mMVs depleted medium in inducing angiogenesis. mMVs also increase HMEC-1 migration rate, independently on the presence of CVRFs, and HMEC-1 wounds in vitro are closed faster when treated with mMVs from obese diabetic patients. In this regard, it has been reported that MVs released from subcutaneous ASCs of obese subjects have impaired pro-angiogenic potential and harbour reduced VEGF, MMP-2 and miR-126 content than those released by ASCs of non obese subjects, reducing their capability to promote EC migration and tube-like structure formation [26]. In addition, previously we have found that TF rich MVs increase neovascularization in ischemic tissue [23], and here we observed that mASCs have high levels of TF that may induce the angiogenic properties of these MVs and are decreased in obese and diabetic patients. HMEC-1 treated with eASCs supernatant (CM, MVs free medium or MVs rich medium) increase the expression of VEGFA, suggesting a potential way of action of ASCs extracellular particles (not only MVs, but also exosomes and other secreted factors). TF induces angiogenesis by ETS1 transcription factor [59] and VEGF is a target gene of ETS1 [60]. However, more experiments on this field should be carried out to elucidate the precise mechanism of action of each different extracellular particle depending of ASCs origen.

Limitations

As a limitation we have to report the low number of cases in this study but the number of heart transplants in one single hospital is low. Organ donations are distributed among patients waiting lists in many different hospitals. The methods and technologies

here reported have to be performed immediately with hearts directly obtained by research investigators waiting at the surgical room to receive the excised heart. At the annex of the operating room the hearts are sampled and taken from the operating room within minutes in the appropriated buffers to the cell biology laboratory for further processing. Therefore only in-hospital transplants could be used. Many other genes and pathways would be analysed if more heart were available.

Conclusions

In the present study we demonstrate for the first time that hearts from patients with advanced heart failure requiring transplant, have ASCs in their different heart adipose tissue depots, and that these ASCs have distinct functional properties. Additionally, we have demonstrated the potential role of mASCs-derived microvesicles on endothelial cell migration that could represent a promising strategy to stimulate spontaneous regeneration and repair in rarefaction areas of the damaged myocardium. Tissue activation and mobilization of resident ASCs could be a potential mean to reduce progression of disease in failing hearts.

Abbreviations

ASCs – Adipose stem cells
CM – Conditional medium
CVD – Cardiovascular disease
CVRF – Cardiovascular risk factor
eASCs – Epicardial adipose stem cells
EAT – Epicardial adipose tissue
HMEC-1 – Human microvascular endothelial cells-1
LAD – Left anterior descendent
MVs – Microvesicles
mASCs – Ventricular myocardium adipose stem cells
mMVS – mASCs derived microvesicles
pASCs – Perivascular adipose stem cells
PVAT – Perivascular adipose tissue
SVF – Stromal vascular fraction
VMAT – Ventricular myocardium adipose tissue
VSMC – Vascular smooth muscle cell

Declarations

Ethics Approval and Consent to Participate

RESULTADOS

Tissue was obtained with informed consent of patients. The protocol was approved by the Research Ethics Committee of the Sant Pau i la Santa Creu hospital and was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki.

Consent for publication

Not Applicable

Availability of data and material

All data generated and materials are included in the manuscript

Competing Interests

The authors declare that they have no competing interests.

Funding

This work was supported by grants from the Spanish Ministry of Science, Innovation and Universities [SAF2016-76819-R to L.B.]; Institute of Health Carlos III, ISCIII TERCEL RD16/00110018; and CB16/11/0041 to L.B. and P17/01321 to GA; FEDER “Una Manera de Hacer Europa”; the Secretary of University and Research, Department of Economy and Knowledge of the Government of Catalonia [2017SGR1480]; and “CERCA Programme/Generalitat de Catalunya” Spain. C.L is recipient of a pre-doctoral grant from the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness of Science [BES-2014-068269]. We thank FIC-Fundacion Jesús Serra, Barcelona, Spain, for their continuous support.

Authors' contributions

C.L. designed and conducted the research; collected the samples; analyzed data and performed the statistical analysis; and wrote the manuscript. G.A. designed and supervised the research; analyzed data and performed the statistical analysis; and wrote the manuscript. MT.B designed and conducted the research; collected the samples; analyzed data and performed the statistical analysis; and wrote the manuscript. J.C. performed, analyzed and interpreted the flow cytometry experiment; M.B. designed and conducted the research; collected the samples; and wrote the manuscript. O.JB designed and conducted the research; collected the samples; performed the histological analysis; and wrote the manuscript. L.B. designed and supervised the research; analyzed data and performed the statistical analysis; and wrote and revised the manuscript. All authors had primary responsibility for the final content and approved the final version of the manuscript.

Acknowledgment

The technical support of Olaya García is gratefully acknowledged. Authors would like to thank the heart failure service of the Sant Pau i la Santa Creu hospital for providing the samples and clinical data. The authors declare no conflict of interest.

Bibliography

1. Orlic D. Adult bone marrow stem cells regenerate myocardium in ischemic heart disease. *Ann N Y Acad Sci.* 2003. p. 152–7.
2. Kawamoto A, Tkebuchava T, Yamaguchi JI, Nishimura H, Yoon YS, Milliken C, et al. Intramyocardial transplantation of autologous endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization of myocardial ischemia. *Circulation.* 2003;107:461–8.
3. Asahara T, Isner JM. Endothelial progenitor cells for vascular regeneration. *J. Hematotherapy Stem Cell Res.* 2002. p. 171–8.
4. Vilahur G, Oñate B, Cubedo J, Béjar MT, Arderiu G, Peña E, et al. Allogenic adipose-derived stem cell therapy overcomes ischemia-induced microvessel rarefaction in the myocardium: Systems biology study. *Stem Cell Res Ther. Stem Cell Research & Therapy;* 2017;8:1–15.
5. Planat-Bénard V, Menard C, André M, Puceat M, Perez A, Garcia-Verdugo JM, et al. Spontaneous Cardiomyocyte Differentiation from Adipose Tissue Stroma Cells. *Circ Res.* 2004;94:223–9.
6. Cao Y, Sun Z, Liao L, Meng Y, Han Q, Zhao RC. Human adipose tissue-derived stem cells differentiate into endothelial cells in vitro and improve postnatal neovascularization in vivo. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;332:370–9.
7. Miranville A, Heeschen C, Sengenès C, Curat CA, Busse R, Bouloumié A. Improvement of postnatal neovascularization by human adipose tissue-derived stem cells. *Circulation.* 2004;110:349–55.
8. Dimmeler S, Leri A. Aging and disease as modifiers of efficacy of cell therapy. *Circ. Res.* 2008. p. 1319–30.
9. 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.
10. Oñate B, Vilahur G, Camino-López S, Díez-Caballero A, Ballesta-López C, Ybarra J, 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.
11. Oñate B, Vilahur G, Ferrer-Lorente R, Ybarra J, Díez-Caballero A, Ballesta-López C, et al. The subcutaneous adipose tissue reservoir of functionally active stem cells is reduced in obese patients. *FASEB J.* 2012;26:4327–36.
12. Talman AH, Psaltis PJ, Cameron JD, Meredith IT, Seneviratne SK, Wong DTL. Epicardial adipose tissue: far more than a fat depot. *Cardiovasc Diagn Ther.* 2014;4:416–29.
13. Calabuig Á, Barba J, Guembe MJ, Díez J, Berjón J, Martínez-Vila E, et al. Grasa epicárdica en la población general de mediana edad y su asociación con el síndrome metabólico. *Rev Española Cardiol [Internet].* 2017;70:254–60. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0300893216303451>
14. Karastergiou K, Evans I, Ogston N, Miheisi N, Nair D, Kaski JC, et al. Epicardial adipokines in obesity and coronary artery disease induce atherogenic changes in monocytes and endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010;30:1340–6.
15. Baker AR, da Silva NF, Quinn DW, Harte AL, Pagano D, Bonser RS, et al. Human epicardial adipose tissue expresses a pathogenic profile of adipocytokines in patients

with cardiovascular disease. *Cardiovasc Diabetol*. 2006;5.

16. Patel VB, Shah S, Verma S, Oudit GY. Epicardial adipose tissue as a metabolic transducer: role in heart failure and coronary artery disease. *Heart Fail Rev*. *Heart Failure Reviews*; 2017;22:889–902.

17. Gruzdeva O, Borodkina D, Uchasova E, Dyleva Y, Barbarash O. Localization of fat depots and cardiovascular risk. *Lipids Health Dis* [Internet]. *Lipids in Health and Disease*; 2018;17:218. Available from: <https://lipidworld.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12944-018-0856-8>

18. Lazaros G, Antonopoulos A, Antoniadis C, Tousoulis D. The Role of Epicardial Fat in Pericardial Diseases. *Curr. Cardiol. Rep*. 2018.

19. Wystrychowski W, Patlolla B, Zhuge Y, Neofytou E, Robbins RC, Beygui RE. Multipotency and cardiomyogenic potential of human adipose-derived stem cells from epicardium, pericardium, and omentum. *Stem Cell Res Ther*. 2016;7.

20. Rubina K, Kalinina N, Efimenko A, Lopatina T, Melikhova V, Tsokolaeva Z, 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.

21. Lopatina T, Mazzeo A, Bruno S, Tetta C, Kalinina N, Romagnoli R, et al. The Angiogenic Potential of Adipose Mesenchymal Stem Cell-derived Extracellular Vesicles is modulated by Basic Fibroblast Growth Factor. *J Stem Cell Res Ther*. 2014;4.

22. Carmeliet P. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature*. 2005. p. 932–6.

23. 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.

24. Cubedo J, Padro T, Badimon L. Glycoproteome of human apolipoprotein A-I: N- and O-glycosylated forms are increased in patients with acute myocardial infarction. *Transl Res*. 2014;164:209–22.

25. 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.

26. Togliatto G, Dentelli P, Gili M, Gallo S, Deregibus C, Biglieri E, 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*. 2016;40:102–11.

27. Arderiu G, Peña E, Aledo R, Juan-Babot O, Crespo J, Vilahur G, et al. MicroRNA-145 Regulates the Differentiation of Adipose Stem Cells Toward Microvascular Endothelial Cells and Promotes Angiogenesis. *Circ Res*. 2019;

28. Mandviwala T, Khalid U, Deswal A. Obesity and Cardiovascular Disease: a Risk Factor or a Risk Marker? *Curr Atheroscler Rep* [Internet]. *Current Atherosclerosis Reports*; 2016;18. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s11883-016-0575-4>

29. Poirier P, Eckel RH. Obesity and cardiovascular disease. *Curr. Atheroscler. Rep*. 2002. p. 448–53.

30. Guglielmi V, Sbraccia P. Epicardial adipose tissue: at the heart of the obesity complications. *Acta Diabetol*. 2017;54:805–12.

31. Matloch Z, Kotulák T, Haluzík M. The role of epicardial adipose tissue in heart disease. *Physiol Res*. 2016;65:23–32.

32. Fitzgibbons TP, Czech MP. Epicardial and perivascular adipose tissues and their influence on cardiovascular disease: Basic mechanisms and clinical associations. *J Am Heart Assoc.* 2014;3:1–15.
33. Lima-Martínez MM, Blandenier C, Iacobellis G. Epicardial adipose tissue: More than a simple fat deposit? *Endocrinol y Nutr (English Ed.)* 2013;60:320–8.
34. Silverman KJ, Lund DP, Zetter BR, Lainey LL, Shahood J a., Freiman DG, et al. Angiogenic activity of adipose tissue. *Biochem Biophys Res Commun [Internet]*. 1988;153:347–52. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006291X88812294>
35. Melincovici CS, Boşca AB, Şuşman S, Mărginean M, Mişu C, Istrate M, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) – key factor in normal and pathological angiogenesis. *Rom. J. Morphol. Embryol.* 2018. p. 455–67.
36. Shibuya M. Vascular endothelial growth factor and its receptor system: Physiological functions in angiogenesis and pathological roles in various diseases. *J. Biochem.* 2013. p. 13–9.
37. Ruge T, Carlsson AC, Larsson A, Årnlöv J. Endostatin: A promising biomarker in the cardiovascular continuum? *Biomark. Med.* 2017. p. 905–16.
38. Kim YM, Hwang S, Kim YM, Pyun BJ, Kim TY, Lee ST, et al. Endostatin blocks vascular endothelial growth factor-mediated signaling via direct interaction with KDR/FK-1. *J Biol Chem.* 2002;277:27872–9.
39. Cross MJ, Claesson-Welsh L. FGF and VEGF function in angiogenesis: Signalling pathways, biological responses and therapeutic inhibition. *Trends Pharmacol. Sci.* 2001. p. 201–7.
40. Arderiu G, Peña E, Aledo R, Badimon L. Tissue factor-Akt signaling triggers microvessel formation. *J Thromb Haemost.* 2012;10:1895–905.
41. Huang H, Bhat A, Woodnutt G, Lappe R. Targeting the ANGPT-TIE2 pathway in malignancy. *Nat Rev Cancer [Internet]*. Nature Publishing Group; 2010;10:575–85. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrc2894>
42. Kroon ME, Koolwijk P, Van Der Vecht B, Van Hinsbergh VWM. Hypoxia in combination with FGF-2 induces tube formation by human microvascular endothelial cells in a fibrin matrix: Involvement of at least two signal transduction pathways. *J Cell Sci.* 2001;114:825–33.
43. Jung J-S, Volk C, Marga C, Navarrete Santos A, Jung M, Rujescu D, et al. Adipose-Derived Stem/Stromal Cells Recapitulate Aging Biomarkers and Show Reduced Stem Cell Plasticity Affecting Their Adipogenic Differentiation Capacity. *Cell Reprogram.* 2019;21:187–99.
44. Semenza GL. Vasculogenesis, angiogenesis, and arteriogenesis: Mechanisms of blood vessel formation and remodeling. *J Cell Biochem.* 2007;102:840–7.
45. 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.
46. Hamdi H, Planat-Benard V, Bel A, Puymirat E, Geha R, Pidial L, et al. Epicardial adipose stem cell sheets results in greater post-infarction survival than intramyocardial injections. *Cardiovasc Res.* 2011;91:483–91.
47. Taimeh Z, Loughran J, Birks EJ, Bolli R. Vascular endothelial growth factor in heart failure. *Nat. Rev. Cardiol.* 2013. p. 519–30.

48. Ranjit PM, Anuradha C, Vishnupriya S, Girijasankar G, Girish K, Chowdary YA. Endogenous angiogenesis inhibitor endostatin: An overview. *Asian J. Pharm. Clin. Res.* 2012. p. 1–8.
49. Siekmann AF, Lawson ND. Notch signalling and the regulation of angiogenesis. *Cell Adh Migr.* 2007;1:104–6.
50. Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature.* 1997. p. 671–4.
51. Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med.* 2003;9:653–60.
52. Badimon L, Borrell M. Microvasculature Recovery by Angiogenesis After Myocardial Infarction. *Curr Pharm Des.* 2018;24:2967–73.
53. Agrahari V, Agrahari V, Burnouf PA, Chew CH, Burnouf T. Extracellular Microvesicles as New Industrial Therapeutic Frontiers. *Trends Biotechnol.* 2019;
54. Bian X, Ma K, Zhang C, Fu X. Therapeutic angiogenesis using stem cell-derived extracellular vesicles: an emerging approach for treatment of ischemic diseases. *Stem Cell Res Ther [Internet]. Stem Cell Research & Therapy;* 2019;10:158. Available from: <https://stemcellres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13287-019-1276-z>
55. Badimon L, Suades R, Arderiu G, Peña E, Chiva-Blanch G, Padró T. Microvesicles in Atherosclerosis and Angiogenesis: From Bench to Bedside and Reverse. *Front Cardiovasc Med.* 2017;4.
56. Kang T, Jones TM, Naddell C, Bacanamwo M, Calvert JW, Thompson WE, et al. Adipose-Derives Stem Cells Induce Angiogenesis via Microvesicle Transport of miRNA-31. *Stem Cells Transl Med.* 2016;5:440–50.
57. Ren S, Chen J, Duscher D, Liu Y, Guo G, Kang Y, et al. Microvesicles from human adipose stem cells promote wound healing by optimizing cellular functions via AKT and ERK signaling pathways 06 Biological Sciences 0601 Biochemistry and Cell Biology. *Stem Cell Res Ther.* 2019;10.
58. Wang S, Aurora AB, Johnson BA, Qi X, McAnally J, Hill JA, et al. The Endothelial-Specific MicroRNA miR-126 Governs Vascular Integrity and Angiogenesis. *Dev Cell.* 2008;15:261–71.
59. 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.
60. Dittmer J. The biology of the Ets1 proto-oncogene. *Mol. Cancer.* 2003.

RESULTADOS

Table 1. Clinical characteristics of the study patients

Variables	Patients
N	30
Age (Years)	54 ± 3
Sex (M/W)	19/11
BMI (Kg/m ²)	27.4 ± 1.0
Obesity (%)	33.3%
Overweigh (%)	20%
Preserved FE (%)	20%
CVRFs	2 ± 1
Smoking (%)*	23 %
HTA (%)**	47%
DM (%)**	17%
DLP (%)**	57%

* Five years ex-smokers were considered non-smokers. ** Treated as per guidelines. CVRF's, cardiovascular risk factors. HTA, hypertension. DM, Diabetes Mellitus. DLP, Dyslipidemia. Values are expressed as mean ± SD or as percentages, when indicated.

Figure 1

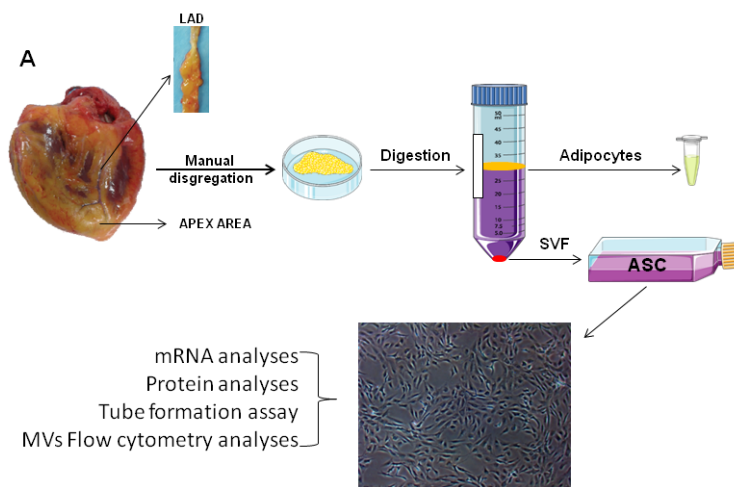


Figure 1. Study design. Ventricular myocardium adipose tissue (VMAT) and perivascular (PVAT) adipose tissue were obtained during heart transplant surgery. ASC were immediately isolated and phenotypically characterized by flow cytometry.

Figure 2

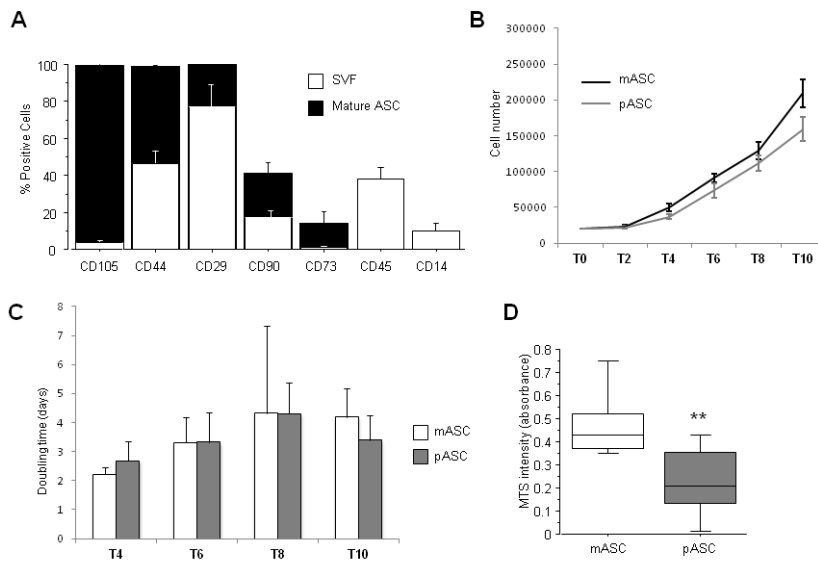
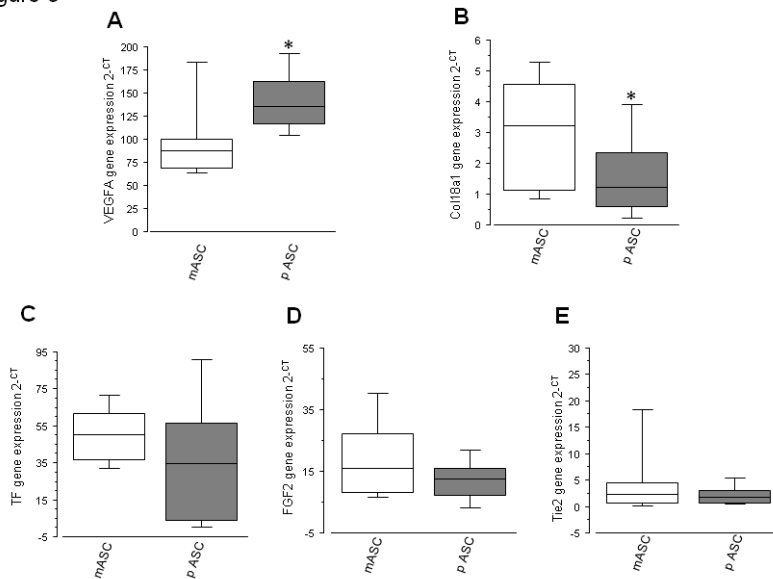


Figure 2. ASC Characterization. **A**) Flow cytometry analysis. Surface mesenchymal stem cell markers were analyzed from the stromal vascular fraction (SVF) and from cells at passage 3. Data is presented as percentage of positive cells. **B**) Growth curves of mASC and pASV. Cells were counted every day after and plotted in a line-curve graph. **C**) Population doubling time (PDT) of mASC and pASC measured every two days from 10 days. **D**) MTS viability assay. (**p<0.01)

Figure 3



RESULTADOS

Figure 3. Box-plot diagram showing ASC genomic profile. A) Differential protein expression of VEGFA in mASC and pASC. **B)** Differential protein expression of COL18a1 in mASC and pASC. **C)** Differential protein expression of TF in mASC and pASC. **D)** Differential protein expression of FGF2 in mASC and pASC. **E)** Differential protein expression of TIE2 in mASC and pASC. (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$)

Figure 4

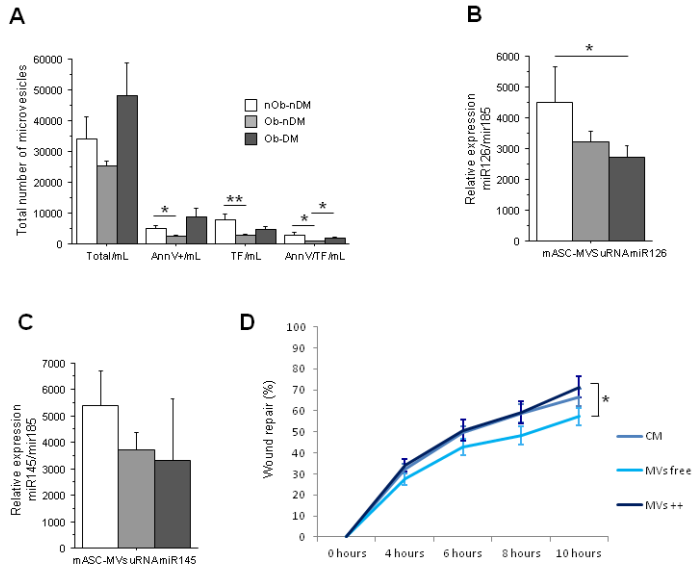


Figure 4. mASC microvesicles (mMVs) secretion. A-C) Influence of obesity and diabetes on eASC derived MVs. **A)** Number of mMVs measured by flow cytometry (Total, Annexin-V positive, TF positive and Annexin-V/TF positive mMVs). **B)** miR126 relative gene expression. **C)** miR145 relative gene expression. **D)** Healing rate line diagram of HMEC-1 cells treated with mASC total medium, mMVs depleted medium or eMVs rich medium. (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$)

Figure 5

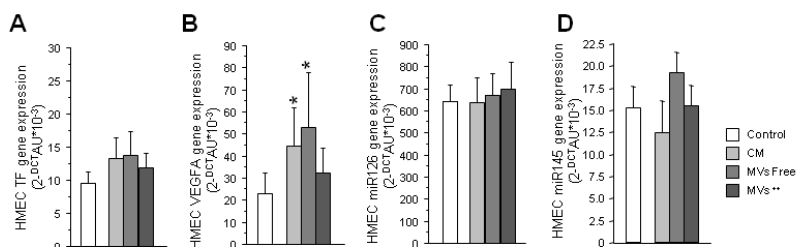


Figure 5. Effect of mASC derived MVs on HMEC-1. Genomic changes of HMEC-1 cells produced by the treatment with mASC total medium, mMVs depleted medium or mMVs rich medium. **A)** HMEC-1 VEGFA gene expression. **B)** HMEC-1 TF gene expression. **C)** HMEC-1 miR126 gene expression. **D)** HMEC-1 miR145 gene expression. (* $p < 0.05$)

Supplementary data.

Supplementary table 1. Adipogenic and osteogenic conditional medium composition.

	Adipogenic	Osteogenic	Negative control
DMEM	82%	88%	89%
FBS	10%	10%	10%
P/S	1%	1%	1%
Dexametasone	1µM	100 nM	-
Indometacine	200 µM	-	-
Insulin	10 µg/ml	-	-
IBMX	0.5 mM	-	-
B-glycerophosphate disodium	-	10mM	-
Ascorbic acid	-	0.05mM	-

DMEM, dulbecco modified Eagle's medium; FBS, Fetal bovine serum; P/S, Penicillin/Streptomycin; BMX, 3-isobutyl-1-methylxanthine

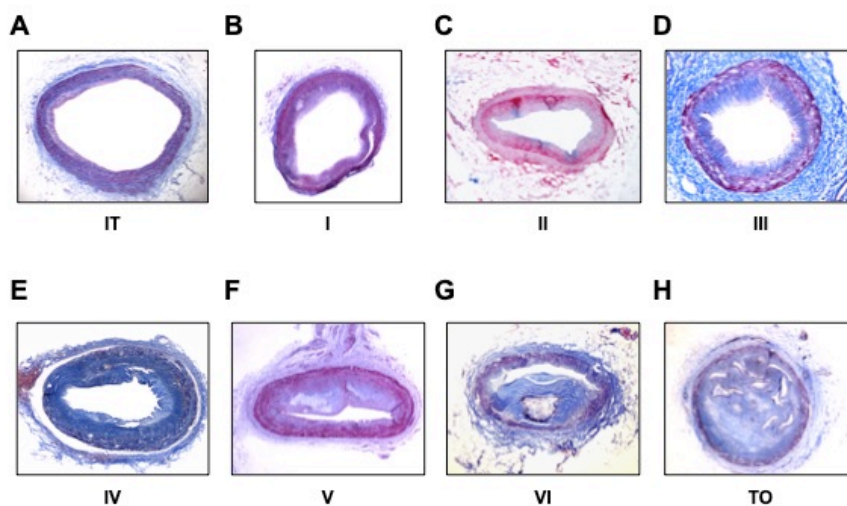
Supplementary table 2. Taqman gene expression assays

Gene	Reference	
GAPDH	Hs02758991_g1	RNA housekeeping gene
F3/TF	Hs00175225_m1	
VEGFa	Hs00900055_m1	
Col18A1	Hs00181017_m1	
miR 186-4p	477940_mir	miRNA housekeeping gene
miR 126-3p	477887_mir	
miR 145-5p	477916_mir	

VEGFa-Vascular endothelial growth factor A; COL18A1- Collagen type XVII-alpha 1 chain; F3 – Factor 3, Tissue factor; GAPDH; Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; GAPDH-).

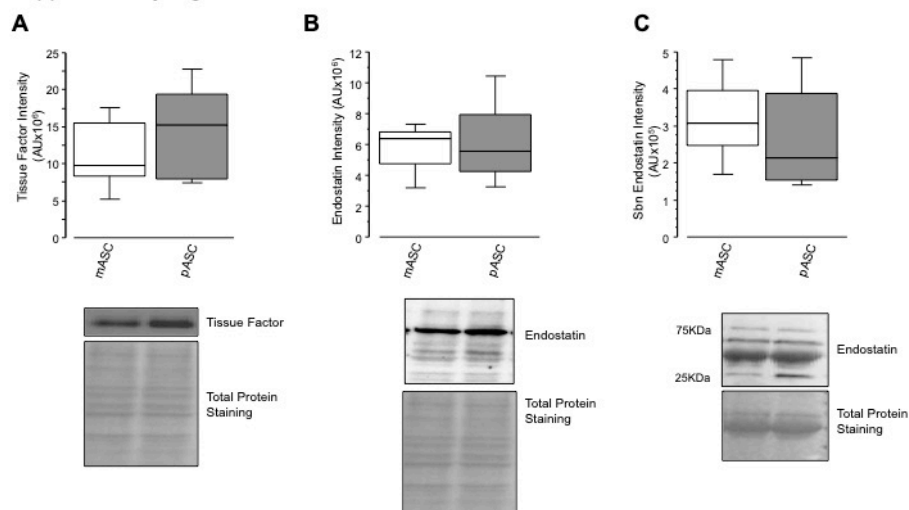
RESULTADOS

Supplementary Figure 1



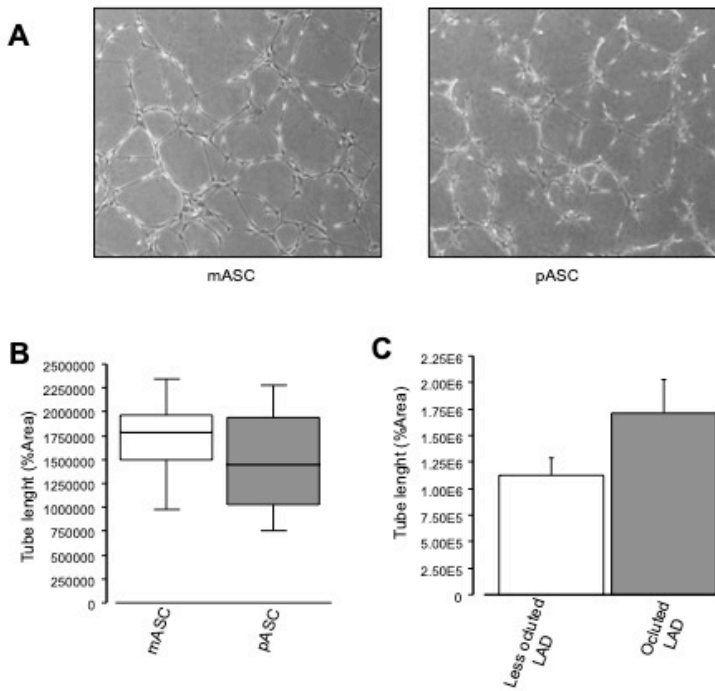
Supplementary Figure 1. A-H) LAD coronary arteries classification. According to the American heart association, LAD coronaries were classified from intimal thickening (IT) to type VI and total occlusion (TO).

Supplementary Figure 2



Supplementary Figure 2. Change in protein levels measured by Western blot. A) Tissue factor protein expression in mASC compared with pASC. **B)** Endostatin protein expression in mASC compared with pASC. **C)** Endostatin protein expression in mASC supernatant compared with pASC supernatant.

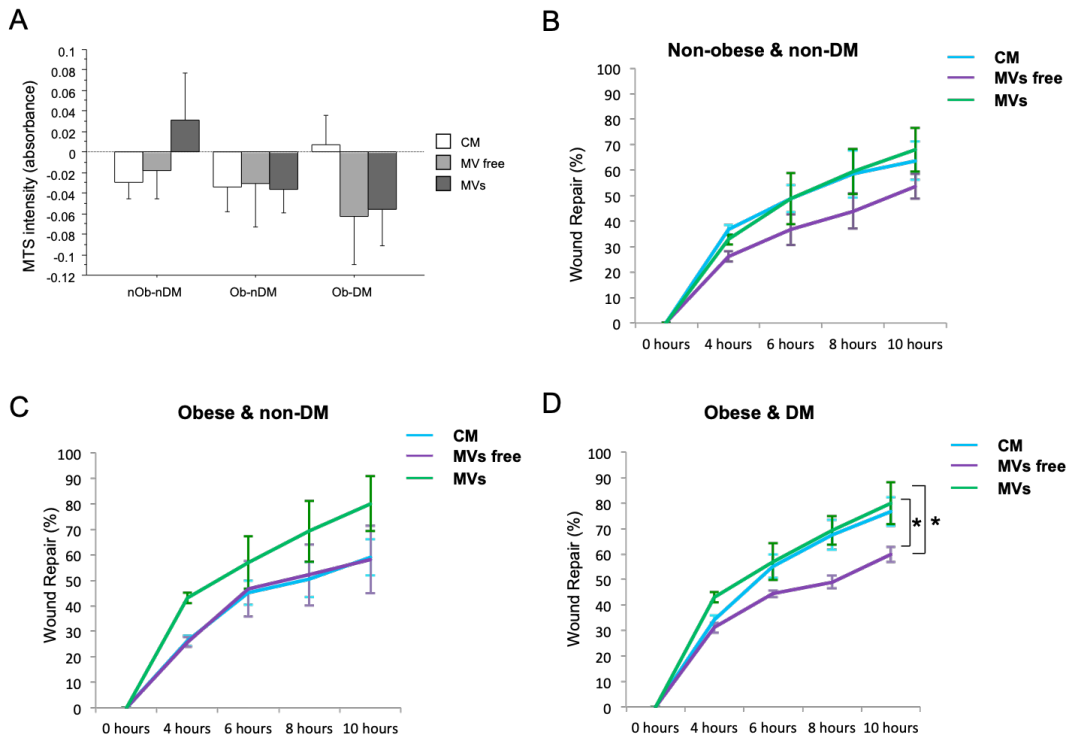
Supplementary Figure 3



Supplementary Figure 3. Tube-like formation assay. A) Representative image of 3D-matrigel-tube formation in mASC and pASC. **B)** Box plot comparing the tube length from the mASC and the pASC. **C)** Bar chart comparing the tube formation potential of pASC from non-occluded LAD coronaries and from occluded LAD coronaries.

RESULTADOS

Supplementary Figure 4



Supplementary Figure 4. Influence of different CRF on mMV proliferation potential. **A)** MTS viability assay. Change on HMEC-1 viability when treated with mMV from patients with different number of CVRFs. **B)** Healing rate line diagram of HMEC-1 cells treated with mASC total medium, mMV depleted medium or mMV rich medium from non-obese and non-diabetic patients. **C)** Healing rate line diagram of HMEC-1 cells treated with mASC total medium, mMV depleted medium or mMV rich medium from obese and non-diabetic patients. **D)** Healing rate line diagram of HMEC-1 cells treated with mASC total medium, mMV depleted medium or mMV rich medium from obese and diabetic patients (*P=0.05).

ARTÍCULO 4

“Cardiovascular risk factors and differential transcriptomic profile of the subcutaneous and visceral adipose tissue and their derived stem cells”

Carmen Lambert¹, Gemma Arderiu¹, Blanca Oñate¹, Carlos Ballesta²,
Juan Ybarra², Lina Badimon^{1,3,4,§}.

¹Cardiovascular Research Center (CSIC-ICCC) and Biomedical Research Institute Sant Pau (IIB-Sant Pau), Barcelona;

²Centro médico Teknon, Barcelona

³Ciber CV, 28029 Madrid, Spain

⁴Cardiovascular Research Chair UAB; Barcelona, Spain

Artículo en preparación

RESUMEN:

Factores de riesgo cardiovascular y perfil transcriptómico de los tejidos adiposos subcutáneo y visceral y sus células madre derivadas.

Los factores de riesgo cardiovascular, individualmente o en conjunto, se han asociado con un mayor riesgo cardiovascular. Entre todos los factores de riesgo modificables, la obesidad afecta a alrededor del 13% de la población y se caracteriza por la acumulación de grasa alrededor del cuerpo. Sin embargo, la ubicación de este tejido adiposo sigue siendo importante para medir el riesgo cardiovascular y no todos los depósitos de grasa inducen el mismo riesgo. En nuestro estudio hemos investigado el efecto de diferentes factores de riesgo cardiovascular, sobre la composición del tejido adiposo subcutáneo y

visceral y su reservorio de células madre. Se utilizó un enfoque transcriptómico para comparar los diferentes perfiles angiogénicos e inflamatorios de los depósitos de grasa subcutánea y visceral de individuos obesos, así como sus células madre adiposas (ASC). Finalmente, se aislaron las microvesículas derivadas de ASC y se analizó su potencial regenerativo. De los 21 genes analizados, sólo 3 aparecieron disminuidos en el tejido adiposo subcutáneo en comparación con el visceral. Además, encontramos que, tanto en el tejido adiposo visceral como en sus ASC, se observa una regulación positiva de la vía del VEGFA. Finalmente, se estudió el papel de las microvesículas secretadas por las ASC en el proceso de regeneración celular mediante un ensayo de migración con células endoteliales, en el que se constató la importancia de las partículas extracelulares en el proceso de regeneración. En resumen, el tejido adiposo subcutáneo de pacientes obesos, expresa un mayor número de moléculas angiogénicas que su grasa visceral, independientemente de la presencia de otros factores de riesgo cardiovascular. Además, hemos demostrado el papel fundamental de las microvesículas extracelulares de ASC en las propiedades angiogénicas del tejido adiposo.

Cardiovascular risk factors and differential transcriptomic profile of the subcutaneous and visceral adipose tissue and their derived stem cells

By

Carmen Lambert¹, Gemma Arderiu¹, Blanca Oñate¹, Carlos Ballesta², Juan Ybarra²,
Lina Badimon^{1,3,4,§}.

From

¹Cardiovascular Research Center (CSIC-ICCC) and Biomedical Research Institute Sant Pau (IIB-Sant Pau), Barcelona; ²Centro medico Teknon, Barcelona ³Ciber CV, 28029 Madrid, Spain ⁴Cardiovascular Research Chair UAB; Barcelona, Spain

Sources of Support: This work was supported by grants from the Spanish Ministry of Science, Innovation and Universities [SAF2016-76819-R to L.B.]; Institute of Health Carlos III, ISCIII TERCEL RD16/00110018; and CB16/11/0041 to L.B. and P17/01321 to GA; FEDER "Una Manera de Hacer Europa"; the Secretary of University and Research, Department of Economy and Knowledge of the Government of Catalonia [2017SGR1480]; and "CERCA Programme/Generalitat de Catalunya" Spain. We thank FIC-Fundacion Jesús Serra, Barcelona, Spain, for their continuous support.

§Correspondence to:

Prof. Lina Badimon
Cardiovascular Research Center,
c/Sant Antoni M^aClaret 167, 08025 Barcelona, Spain.
Phone: (34) 935565880. Fax: (34) 935565559.

Abstract

Background. Cardiovascular risk factors, individually or as a cluster, have been associated with an increased cardiovascular risk. Among all the modifiable risk factors, obesity affects around 13% of the total population being characterized by fat accumulation around the body. However, the location of this adipose tissue remains important in order to measure the cardiovascular risk and not all the fat depots induce the same risk. In our study we have investigated the effect of different CVRFs, on the subcutaneous and visceral adipose tissue composition and their mesenchymal reservoir.

Methods. A transcriptomic approach was used to compare the different angiogenic and inflammatory profile of the subcutaneous and visceral fat depots from obese individuals as well as their derived adipose stem cells (ASC). Influence of other risk factors in fat composition was also measured. Finally, ASC derived microvesicles were isolated and their potential regenerative potential analyzed by molecular and cellular analysis.

Results. From the 21 angiogenic-related genes analyzed, only 3 appeared decreased on the subcutaneous adipose tissue compared with the visceral. ASC from both fat depots were also isolated and compared, finding a significant up-regulation of the VEGF-pathway on the visceral derived ASC. Finally, the ASC released microvesicles were used to improve the wound-healing rate on human microvascular endothelial cells.

Conclusions. The subcutaneous adipose tissue from obese patients, expresses a greater number of angiogenic molecules than their visceral fat, independently on the presence of other CVRFs. Also, we have demonstrated the pivotal role of ASC extracellular MVs on the angiogenic properties of the adipose tissue.

Introduction

The adipose tissue (AT) is widely distributed all around the organism, and constitute between 15 and 25% of the total body mass, achieving up to 40% of body mass on obese individuals due to its plasticity in adulthood ^{1,2}. AT is of mesenchymal origin, and it can be subdivided in white AT (WAT) and brown AT. AT is a heterogeneous organ due not only to the existence of different AT types, but also because of its multi-depot distribution. Although WAT is distributed throughout the body, its principal deposits are peripheral subcutaneous tissue (SAT) that is present on hips and thighs, where it acts as an energy storage system, and the visceral or intra-abdominal region (VAT), where it protects against possible trauma. There is substantial evidence that accumulation of VAT shows a higher angiogenic potential and more acute inflammatory profile, conferring a much higher cardiovascular risk than SAT, instead, a protective role against cardiometabolic disease has been attributed to SAT ³⁻⁵. Moreover, not all the VAT depots exhibit the same behaviour in relation to obesity-associated inflammation and metabolic disturbances, three different VAT depots (mesenteric, omental, and periaortic), from patients with cardiovascular disease (CVD), show important differences in their inflammatory profile ⁶.

VAT and SAT show different adipokine expression profiles, distinct functions, morphologies, distributions, vascular density, and innervations ^{7,8}, but both are composed by mature adipocytes and several other cells including preadipocytes, endothelial cells, and inflammatory cells, being considered as a large and accessible reservoir of mesenchymal stem cells ^{2,9,10}, which all together compose the stromal vascular fraction (SVF) ¹¹.

AT is connective tissue specializes in accumulating fat into adipocytes, being therefore considered an energy storage and endocrine organ. However, in the last decades, adipose tissue has also been considered a rich source of adult stem cells, denoted as adipose-derived stem cells (ASCs) ¹². ASCs are currently the focus of interest in the field of inducible spontaneous regeneration and cell therapy ^{13,14}. Although ASCs have been shown to participate in tissue repair, their precise mechanism of action is still unknown. Many groups have focused on the ASCs isolated from the AT, and it is believed that their most relevant mechanism proceeds via paracrine actions ¹⁵⁻¹⁸.

There are some studies, both in human and animal models, reporting the different behavior of ASCs depending their origin (VAT or SAT) and their role on angiogenesis, there is little agreement on the functional depot specificity effect of the WAT ^{8,11,19-21}. The aim of this study was to identify and validate genes transcribed by VAT and SAT of

RESULTADOS

the same obese individuals, not only by their total fat tissue, but also in their isolated ASCs. We also investigated the effect of comorbidities (CVRF) in addition to obesity on WAT angiogenic capacity.

Besides this general data, all the WAT characteristics and properties are depot-specific. Therefore, it is important to study each depot individually for the better understanding of this paracrine organ^{8,20}.

Materials and Methods

Patient recruitment and adipose tissue sampling

Subcutaneous abdominal white adipose tissue (sWAT) and visceral white adipose tissue (vWAT) were obtained via surgical resection from young individuals with morbid obesity (BMI > 40 kg/m²; n = 22) that underwent bypass gastric surgery. In these obese patients, WAT was obtained simultaneously from subcutaneous and visceral depots during surgery. Additionally we collected adipose tissue from young non-obese individuals (BMI < 25 kg/m²; n = 15) who underwent abdominal lipectomy. Informed consent was obtained from all donors and the study protocol was approved by the Centro Medico Teknon Ethical Committee that is consistent with the principles of the Declaration of Helsinki. Patients used regular medication as recommended in the guidelines if it was necessary (**Table 1**).

RNA and cDNA isolation from adipose tissue.

Flash frozen adipose tissue was crushed using mortar and pestle, and then RNA extraction was performed using a combination of organic extraction with Qiazol Reagent (Qiagen) and silica-membrane columns with the Qiagen RNeasy Mini Kit (Qiagen). RNA quantity was determined with Nanodrop ND-1000 spectrophotometer (Nanodrop Technologies). RNA quality was measured using 2100 Bioanalyzer technology (Agilent Technologies) with the Agilent RNA 6000 Nano Kit (Agilent Technologies) and assessed by the RNA integrity number (RIN). Only RNA samples with RIN values over 6 were chosen for real time PCR experiments.

First strand cDNA synthesis was performed using the High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems, Life Technologies) from 500 ng of tissue extracted RNA according to manufacturer's instructions.

Transcriptomic analysis and qPCR

A custom gene expression low density array designed by Applied Biosystems (Life Technologies) to characterize inflammation and angiogenesis was performed by quantitative PCR using TaqMan® Gene Expression assays (**Table 2**) using 200 ng of every sample following manufacturer's instructions. TaqMan™ fluorescent real-time PCR primer used for TF (Hs00175225_m1), VEGFA (Hs00900055_m1), miR126-3p (477887_mir), miR145-5p (477916_mir) and GAPDH (Hs99999905_m1), GUSB (Hs99999908_m1) and miR186-5p (477940_miR) (Applied Biosystems) which were

RESULTADOS

used as endogenous control. PCR data was analyzed with RQ Manager 1.2.1 and DataAssist 2.0 softwares (Applied Biosystems, Life Technologies) against the endogenous controls to obtain expression values for every gene ($2^{-\text{DCt}}$).

Bioinformatic analysis

The statistically significant neural network and the canonical pathway in which the studied genes were involved were generated with IPA software (Ingenuity System, www.ingenuity.com). The functional analysis of a network was used to identify new target genes involved in the predicted pathways analysed. The network molecules associated with biological functions and/or diseases in the Ingenuity Knowledge Base were considered for the analysis.

ASCs isolation and characterization

Subcutaneous and visceral omental adipose tissues were washed with sterile phosphate buffered saline (PBS) supplemented with 100 U/ml of penicillin and 100 µg/ml of streptomycin. Tissue was digested into a type I collagenase solution (1 mg/ml; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and incubated for 1 hour in a 37°C pre-warmed orbital shaker. Collagenase activity was neutralized with the same amount of fetal bovine serum (FBS; Biological Industries, Kibbutz Beit-Haemek, Israel) and the suspension filtered through a 100 µm mesh filter to eliminate remaining tissue fragments, then the solution was centrifuged at 1200 rpm for 10 min to separate the adipocytes and to obtain the stromal vascular fraction (SVF). Isolated SVF cells were counted and either analyzed by flow cytometry or plated onto a 25 cm² culture flasks. After 24 hours, non-adherent cells were removed and the medium replaced. Cells were expanded in a humidified environment at 37°C with 5% CO₂, 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 4.

For cell cytometry characterization, cell surface antigen phenotype was performed on ASCs of the SVF at passage 3 (P3). The following cell-surface epitopes were marked with anti-human antibodies: CD 105, CD 44, CD 29, CD 90, CD 73, CD 45 and CD 14. 1×10^5 cells at P3 or 1 mL of the SVF were suspended in flow cytometry buffer (PBS, 0.1% BSA, 0.1% sodium azide) and incubated for 30 min at 4°C with the corresponding antibodies. After that, reaction was stopped by adding 500 µL of flow cytometry buffer

or 250 μ L of Quicklysis reagent (Cytognos) in the case of the SVF. Quicklysis was incubated for 15 min at room temperature to eliminate erythrocytes and reaction stopped by adding other 250 μ L of flow cytometry buffer.

Cellular events (at least 30,000 in the case of P3 cells and between 10,000 and 60,000 in the case of the SVF) were acquired and analysed by Fluorescence-activated cell sorting using Coulter EPICS XL flow cytometer (Beckman Coulter) running Expo32 ADC XL 4 colour software (Beckman Coulter).

MTS viability/proliferation analysis

Cell proliferation was determined by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulphophenyl)-2H-tetrazolium (MTS) assay (CellTiter 96 Aqueous One Solution cell proliferation assay kit; Promega). For this assay, 15×10^3 cells were seeded in triplicates into 96-well plate, and 24 h later, 10 ml of MTS per well were added and then incubated for other 2 hours while MTS tetrazolium is reduced to formazan (490 nm absorbance) by the metabolically active cells. The absorbance was then quantified. Formazan production was directly related with the number of cells alive in the culture.

Microvesicles isolation

ASCs derived microvesicles (MVs) were isolated by ultracentrifugation of P3 cell supernatants as previously described ²². Briefly, fresh supernatants were firstly centrifuged at 900 g for 15 minutes to eliminate cell debris and then at 20,000 g for 45 minutes to isolate the MVs as a pellet. MVs concentration was determined by flow cytometry. For that, MVs were washed with a PBS-citrate buffer and centrifuged again at 20,000 g for 30 minutes. MVs were extracted with PBS-citrate buffer and incubated with Annexin V (CF Blue ANXV, Immunostep) and anti-TF antibody (FITC conjugated 4508CJ, Sekisui). Samples were then diluted with Annexin V binding buffer (BD Bioscience) to stop the reaction and then analyzed on a FACSCantollTM flow cytometer (BD Bioscience).

Cell Migration and wound healing Assay

For the cell migration assay, human microvascular endothelial cells (HMEC-1) (ATCC) were used. Briefly, 2.3×10^4 ASCs were seeded into 100 mm dish and cultured with MCDB 131 medium supplemented with 10% of FBS for 48h to allow cells to secrete MVs. The day after, 2.5×10^5 HMEC-1 cells were seeded into a culture-Insert 2 well dish (Idibi) and kept with MCDB 131 supplemented with 10% of FBS overnight. MVs from

RESULTADOS

the ASCs supernatant were isolated and before performing the experiment, the insert was removed by using sterile tweezers and the dish washed with PBS to remove cell debris. Cells were treated with 600 μ l of: A) Conditional medium from ASCs after 48h of culture; B) Conditional medium from ASCs without MVs after 48h of culture; and C) ASCs derived MVs rich medium. In all conditions medium was supplemented with 2% of FBS. Cell migration and wound repair were controlled every 2 hours for 12 hours. Wound areas were analyzed by using Image J software. Protein, RNA and microRNA were isolated from the ASCs, microRNA from the MVs and RNA and microRNA from the HMEC-1 cells after 24 hours of cell migration.

Gene expression analysis from ASCs

Total RNA was isolated from ASCs in silica-membrane columns with the Qiagen RNeasy Mini Kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions.

MirVana miRNA isolation kit (Life Technologies) was used to extract microRNA from the cells, and miRNeasy Serum/Plasma Kit for the microRNA isolation from MVs, according to the manufacturer's instruction.

RNA and microRNA quantity was determined with Nanodrop ND-1000 spectrophotometer (Nanodrop Technologies). Isolated total RNA was reverse-transcribed into cDNA using High Capacity cDNA Archive kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), and microRNA with the TaqMan advanced miRNA assay (Life Technologies). Gene expression analysis was carried out by quantitative 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 the correspondent housekeeping gene expression.

Western Blot analysis

Protein was extracted from total cell lysates by using RIPA buffer (50 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% sodium Deoxycholate, 0.1% SDS) or from 48 hours cell supernatant. Protein concentrations were measured with Pierce BCA Protein Assay Kit (ThermoScientific). Twenty-five micrograms of protein were resolved by 1-DE under reducing conditions onto 10% SDS-PAGE gels and electrotransferred to nitrocellulose membranes. After blocking for non-specific binding, membranes were incubated with primary antibody; TF and beta-actin. Band detection was performed using a chemiluminiscent substrate dye (SuperSignal® West Dura Extended Duration Substrate, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) and a molecular imager ChemiDoc XRS System, Universal Hood II (BioRad, Hercules, CA, USA). Band quantification was

performed with Quantity-One software (BioRad laboratories, Hercules, CA, USA). Protein load was normalized with beta actin.

Statistical analysis

Data are expressed as mean and standard error unless stated. N indicates the number of subjects tested. Statistical analysis was performed with Stat View 5.0.1 software (Abacus Concept). Kolmogrow-Smirnov test was performed to assess sample normality and then, non-parametric Willcoxon or Mann Withney analysis or parametric t-test analysis was performed depending on the compared samples and gene expression distribution. A P-value ≤ 0.05 was considered significant.

Results

Influence of obesity on the subcutaneous adipose tissue and ASCs profile

A custom gene expression assay was first performed to assess the differential gene expression of 24 genes in subcutaneous adipose tissue (sWAT) obtained from obese or non-obese individuals (**Figure 1A; Supplemental table 1**).

A significant up-regulation of genes involved in inflammation, immunity and cell proliferation was observed in the sWAT of obese compared to non-obese individuals; *AGER, CAPG, CD34, CD68, IFI30, NOTCH3* AND *SPP1* (**Table 3; Figure 1B**). On the contrary, three genes involved in angiogenesis and one involved in energy homeostasis were down-regulated in sWAT of obese compared to non-obese individuals; *DLL4, PLIN2, VEGFA* and *PNPLA2* (**Table 3; Figure 1B**). Also, a direct correlation between BMI and the gene expression was observed in *AGER, ANGPT2, CD68, IFI30, NOTCH3* and *SPP1* (**Supplementary Figure 1 A-F**), whereas an inverse correlation was achieved for *DLL4, PLIN, PNPLA2* and *VEGF* (genes that were down-regulated due to obesity) (**Supplementary Figure 1 G-J**).

Ingenuity Pathway Analysis (IPA[®]) data was used to identify new targets of the networks affected by this changes. The main affected network was related to *the “cardiovascular system development and function, tissue and cell morphology”*, with a score of 38 and 16 of our studied genes involved (**Supplementary Figure 2A**).

Next, we investigate the angiogenic potential of the ASCs from the sWAT of those obese and non-obese subjects and we found non-significant changes on the analyzed genes due to obesity (**Figure 2**).

Influence of fat location on the genomic profile of the adipose tissue and their ASCs

Subcutaneous and the visceral adipose tissue and their derived ASCs, obtained simultaneously from the obese patients during bariatric surgery, were investigated (**Figure 3A; Supplemental table 1**).

This sWAT from obese individuals was previously compared with sWAT from non-obese (**Figure 1**). sWAT showed higher expression levels compared to vWAT of different genes involved in inflammation and angiogenesis, *ANGPT1, ANGPT2, CAPG, CD68, NOTCH3, PECAM1, PTX3, SERPINF1, SPP1, TEK* and *TNC* as well as in *PNPLA2*, which are involved in energy homeostasis. In contrast, *AGER, PGF* and

VEGFA were non-significantly less expressed in sWAT compared with vWAT (**Figure 3B; Table 4**).

To elucidate whether obesity was the main cause of these changes or on the contrary other CVRFs were involved, we decided to exclude those obese subjects without any other CVRFs, and evaluate again the genes of study discovering that most of these genes maintain the trend previously observed in sWAT and vWAT, except for PTX3, which lost the significance and IFI30, which achieved a significant higher expression in sWAT compared with vWAT (**Table 4**).

Next, we investigated each CVRFs independently. First, we compared expression levels in subcutaneous and visceral fat of obese/diabetic and obese/non-diabetic subjects. There was no significant difference due to diabetes in sWAT nor in vWAT gene expression (**Supplemental Table 2**). However, comparative analysis of sWAT and vWAT from obese diabetic patients showed one gene that was significantly higher expressed in sWAT, NOTCH3. In contrast, when obese non-diabetic patients were analyzed, eleven genes were significantly modified, all of them overexpressed in the sWAT; ANGPT1, ANGPT2, CD68, DLL4, NOTCH3, PECAM1, PNPLA2, PTX3, SERPINF1, SPP1 and TNC (**Table 4**).

When we studied the effect of dyslipidemia, only one gene was significantly reduced in sWAT *COL18A1*. No changes regarding to dyslipidemia were observed in vWAT (**Supplemental Table 3**). We also analyzed the different behavior of sWAT and vWAT of obese DLP patients and we found nine genes overexpressed on sWAT compared with vWAT; ANGPT1, ANGPT2, DLL4, NOTCH3, PECAM1, PNPLA2, SERPINF1, SPP1 and TNC. On the other hand, when we compared sWAT and vWAT of obese DLP patients, we observed that seven genes were more expressed on sWAT compared with vWAT; ANGPT1, ANGPT2, DLL4, NOTCH3, PECAM1, PNPLA2, SERPINF1, SPP1 and TNC. Contrariously, only one gene was reduced in the sWAT compared with vWAT, PTX3.

Finally, we investigated the effects of arterial hypertension (HT) on the angiogenic potential of both sWAT and vWAT, and we observed a significant higher expression of ANGPT1 and a significant reduced expression of TNC on the sWAT of obese HT patients compared with obese nHT patients (**Supplemental Table 4**). We also analyze the genomic changes between sWAT and vWAT of HT patients, finding a higher expression of six genes in sWAT compared with vWAT; IFI30, NOTCH3, PLIN2, PNPLA2, SERPINF1, and TNC. When we analyze those obese nHT patients we observed that VEGFA was significantly reduced in sWAT. In addition, other eight genes

RESULTADOS

showed a higher expression on sWAT compared with vWAT; ANGPT1, ANGPT2, DLL4, NOTCH3, PECAM1, SERPINF1, SPP1 AND TNC (**Table 4**).

We further analyzed the networks in which these genes were involved using the IPA software analysis to then investigate new targets associated to the observed changes and found that, since the genes analyzed were the same, the same network as the observed in the subcutaneous fat was affected; “*Cardiovascular system development and function, tissue and cell morphology*”, also with a score of 38 and 16 molecules involved (**Supplemental Figure 2B**).

Finally, the comparison of the differential expression of angiogenesis-related genes in ASCs from these fat depots yielded a significant down-regulation of the proangiogenic gene TF ($P < 0.001$; **Figure 4A**) and of microRNA miR126-3p ($P = 0.015$; **Figure 4C**) in the subcutaneous derived ASCs, whereas miR145 was over-expressed ($P < 0.001$; **Figure 4D**). These changes were reduced but the significance maintained if we separate patients by the presence or absence of diabetes in all cases but in the case of miR126 where the significance was lost when comparing diabetic patients (**Figure 4A,B and C**). Also, we observed a significant increase in the expression of VEGFA in the visceral ASCs from diabetic patients compared with non-diabetics ($P = 0.019$; **Figure 4B**).

Effect of subcutaneous and visceral ASC derived microvesicles in wound repair

In order to analyze the angiogenic potential of these ASCs on endothelial repair, a wound healing assay with human microvascular endothelial cells (HMEC-1) treated with the microvesicles (MVs) released by the ASCs was performed.

The number of MVs released by each cell type was measured by flow cytometry. No differences were found in the number of MVs released by the subcutaneous derived ASCs (sMVs) or the visceral derived ASCs (vMVs). However, we found that cells from obese and diabetic patients released more number of Annexin V positive MVs than cells obtained from obese non-diabetic patients ($P = 0.014$; **Figure 5A**). When we separated groups by adipose tissue location, we found that this significance was only maintained in the sMVs ($P = 0.028$; **Supplementary figure 3A**), but disappeared in the vMVs (**Supplementary Figure 3A**). Moreover, we found a significant increased expression in the miRNA-145 from the sMVs compared with the vMVs (**Figure 5B**)

Next, we studied how these MVs affect the HMEC-1 by using a MTS viability assay. For these we treated HMEC-1 with normal conditioned medium (CM) from ASCs, CM without MVs (MVs free) and finally medium rich in MVs (MVs⁺⁺), and found that, even

thought there were non significant differences, HMEC-1 treated with subcutaneous ASCs supernatant were more viable than those treated with visceral ASCs supernatant (**Figure 5C** and **Supplementary Figure 3B**).

We decided to analyze the different behavior of the microvesicles released from ASCs on a wound-healing assay. Wound healing was quantified by measuring the covered surface during 24 hours. HMEC-1 cells were treated with CM, MVs free medium and MVs⁺⁺. Wound repair was evaluated at 0, 6, 8 and 10 and after 24 hours we collected the ASCs for microRNA extraction. All results were corrected by the number of MVs.

We observed that, in obese patients, after 6 and 10 hours of cell migration, the MVs enriched medium induced an improved healing compared with the MVs depleted medium from both subcutaneous ASCs (N=11; 10h: P=0.055 **Figure 5D**) and visceral ASCs (N=6; 6h: P=0.037; 10h: P=0.010; **Figure 5D**). The same trend was observed if we subdivided groups by the presence of obesity and diabetes, only achieving significance in the cells treated with vMV rich medium from diabetic patients, compared with both the CM and the MVs depleted medium (P=0.049 both; **Supplementary Figure 4A-B**).

We then performed a genomic analysis of the RNA and the microRNA from the receptor HMEC cells and the ASC derived MVs. Beside the changes observed in the wound-healing rate due to the presence of MVs, the genomic profile of HMEC-1 was not significantly modified. HMEC-1 treated with both CM and MVs⁺⁺ from either subcutaneous or visceral derived ASCs stimulated the expression of TF, whereas MVs free medium induced a reduction (**Figure 6A**). VEGFA expression was stimulated in all the tissues and with all treatments (**Figure 6B**). When comparing between treatments, the expression of VEGFA was reduced on those cells treated with a medium rich in vMV compared both with the CM (P=0.077) and the MVs depleted medium (P=0.096; **Figure 6B**). Finally, the expression of miR126-3p was blocked by the presence of medium resulting from ASCs culture; above all if the medium came from visceral derived ASCs (**Figure 6C**). However, no significant changes were observed.

Discussion

The risk of suffering cardiovascular disease depends largely on the presence of diverse environmental and genetic factors. Cluster of CVRFs (cCVRFs) has been associated with an increased cardiovascular risk; the higher the number of CVRFs, the higher the risk of suffering a cardiovascular event^{23,24}. Obesity is one of the most common modifiable risk factor, in fact, in 2016, 39% of the total world population suffered overweight, and around the 13% obesity^{25,26}. Obesity induces an immunodeficiency state associated to chronic inflammation and therefore, increasing the risk of suffering diverse pathogenic conditions, including cardiovascular disease, diabetes mellitus (DM) and cancer^{27,28}. In our study we have used a transcriptomic approach to investigate the effect of different CVRFs, individually or as a cluster, on the angiogenic and inflammatory behavior of the adipose tissue from two different depots, the subcutaneous adipose tissue (sWAT) and the visceral adipose tissue (vWAT). For this, we have analyzed 21 genes involved in different angiogenesis or inflammation pathways. Although some studies have been focused on the angiogenic and inflammatory properties of adipose tissue derived stem cells (ASCs)^{1,17,29,30}, the effects of the different adipose tissue depots are still unclear. Additionally, we have isolated the ASCs from these fat depots to investigate the behavior of fat tissue and its resident stem cells.

In the sWAT, a significant reduction of the VEGFA expression and an increase in *Serpin Family F Member 1* (SERPINF1, also known as *Pigment epithelium-derived factor*, PEDF) expression was observed with respect to the vWAT from same patients in the obese group. Since PEDF can inhibit VEGF-mediated angiogenesis in the endothelial cells (EC) by activating γ -secretase, which cleaves the VEGFR after the translocation of the C-terminal region of the receptor³¹⁻³³, a significant inhibition of angiogenesis ensues in obese sWAT. However, no difference was observed when we analyze the VEGFA gene expression on the subcutaneous ASCs from both obese and non-obese subjects, suggesting that the angiogenic potential of the sWAT could be related with non-mesenchymal cell components of the fat tissue. Contrary to what we could expect from previous studies³⁴⁻³⁶, the levels of the adipose tissue triglyceride lipase PNPLA2, gene involved in maintenance and development of the WAT as well as in energy homeostasis, was significantly lower on the subcutaneous fat of obese patients compared to non-obese.

It is clearly accepted that sWAT and vWAT have different composition and different metabolic influence and thus each depot has a different transcriptome and proteome³⁷⁻³⁹. Here, we have observed a higher pro-angiogenic gene expression in sWAT

compared with vWAT from obese patients, as from the 21 genes analyzed, only 3 has a higher expression in vWAT.

AT is composed by adipocytes and preadipocytes, stromal cells, macrophages and leukocytes among others, which secrete inflammatory and angiogenic factors, being therefore central mediators of the angiogenic process³⁰. Here, we have observed that in obese patients, different angiogenic pathways are activated depending on the AT depots analyzed. In sWAT compared with vWAT, we have evidenced that the VEGF-mediated angiogenic pathway, which involves genes such as PGF, VEGFA and PEDF, is partially blocked. However, other pathways such as the ANGPT and NOTCH pathways among others were enhanced (**Figure 7**). Also in sWAT compared with vWAT, there is a significant overexpression on ANGPT1 and ANGPT2 as well as their receptor TIE2. This ANGPT-TIE2 system, gives a connection between the angiogenic and the inflammatory pathways⁴⁰. ANGPT1 induced TIE-2 phosphorylation (p-Tie-2), which leads to the maintenance of EC stability. The role of ANGPT1 and VEGFA on the blood vessel growth seems to be complementary, since both genes can induce TIE-2 phosphorylation and therefore maintain endothelial homeostasis⁴¹. On the contrary, ANGPT2 does not induce p-Tie-2 and therefore is considered as an ANGPT1 antagonist. However, ANGPT2, which is mainly produced by EC, promotes angiogenesis by promoting the dissociation of pericytes from old vessels and facilitating the liberation of diverse pro-angiogenic and pro-inflammatory molecules⁴⁰⁻⁴². In addition to the observed effects on the ANGPT-TIE2 system, we also observed an increased expression of NOTCH3 and its ligand DLL4 on the sWAT compared with the vWAT. Notch signaling pathway is composed by four receptors (Notch1-4) and five membrane-bound ligands (Jag1-2 and DLL1,3 and 4)⁴³. When these ligands interact with any of the receptors, TNF α and γ -secretase induce the cleavage of the intracellular NOTCH-domain, which translocate to the nucleus, where it activates target genes expression responsible of different cellular decisions and functions. NOTCH activation enhanced the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/AKT pathway promoting cell migration and proliferation and therefore, promoting angiogenesis⁴⁴⁻⁴⁷ (**Figure 7**).

Besides the differential regulation of these three pathways between the different AT depots, other genes were also differentially expressed. Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM1), Endoglin (ENG) and advanced glycation end-products (AGER) were more expressed on the sWAT compared to the vWAT. These three genes have an important role in the PI3K/AKT cell migration and proliferation related pathways. In fact, ENG and PECAM1 have a great influence over one another, and PECAM1 deficiently is associated with ENG reduction^{48,49}. Capping Actin Protein

RESULTADOS

(CAPG) is also more expressed in sWAT than in vWAT. CAPG is a member of the gelsolin family, with an important role in endothelial and fibroblast cell motility as well as in macrophages conservation^{50,51}. The inflammatory pathway was also differentially regulated between both tissues, higher levels of CD68, a monocytes and macrophages surface marker were observed in sWAT compared with vWAT, as well as an increased expression of the interferon-gamma-inducible protein 30 (IFI30), expressed by macrophages⁵² and tenascin-C (TNC), protein with roles both in inflammation and in cell migration and proliferation^{53,54}. It is important to point out that all these differences disappeared if we only study the obese-diabetic group, due to the fact that sWAT from obese patients might have a protective angiogenic role, whereas when obesity is accompanied by other metabolic diseases, sWAT could be as deleterious tissue as vWAT. Regarding the mesenchymal stem cell reservoir in these adipose tissues, we observed no significant changes in VEGFA expression, up-regulation in TF (F3) and miR-126 expression and down-regulation in miR-145 expression in the vWAT-ASCs with regards to sWAT-ASCs. miR-126 inhibits PIK3R2 and SPRED1, genes that in turn inhibit VEGFA⁵⁵, on the contrary, miR-145 has VEGFA as a direct target⁵⁶. However, PIK3 is required for Tie-2 activation by ANGPT1, being Tie-2 and ANGPT1 therefore negatively regulated by miR-126 levels⁵⁷. These results support the up-regulation of VEGFA, seen in the total visceral fat analysis, as well as the ANGPT1 and TIE-2 reduction. But unlike to what we saw in the total fat tissue, these changes are not affected by the presence of diabetes mellitus.

ASCs secrete MVs that may be involved in crosstalk function with target cells^{58,59}. In our study we found improved wound healing and viability in the endothelial cells treated with sWAT-ASCs derived MVs. However, this repair function was not VEGF-dependent.

AT can be largely distributed around the human body, and therefore, its properties and composition differ from one location to the other. In this study we have analyzed, for the first time, the angiogenic potential of the subcutaneous and visceral adipose tissue and their derived stem cells, as well as their extracellular MVs. Even though more studies in this field are needed, we can conclude that the adipose tissue is a very active organ, independently on the location. The subcutaneous adipose tissue from obese patients, expresses a greater number of angiogenic molecules than their visceral fat, independently on the presence of other CVRFs. However, the VEGF pathway is partially blocked in sWAT, both compared with the visceral adipose tissue and with the subcutaneous adipose tissue from lean healthy donors. We have also observed that, even though adipose tissue composition is very heterogeneous, the

adipose stem cells and their derived microvesicles have a pivotal role in the angiogenic properties of the adipose tissue.

Acknowledgment

The authors would like to thank Dr. Sandra Camino for her help in performing the genomic analysis. The technical support of Olaya García is gratefully acknowledged.

Bibliography

1. Corvera, S. & Gealekman, O. Adipose tissue angiogenesis: Impact on obesity and type-2 diabetes. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease* **1842**, 463–472 (2014).
2. Badimon, L., Oñate, B. & Vilahur, G. Adipose-derived mesenchymal stem cells and their reparative potential in ischemic heart disease. *Revista Espanola de Cardiologia* **68**, 599–611 (2015).
3. Fantuzzi, G. & Mazzone, T. Adipose tissue and atherosclerosis: Exploring the connection. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **27**, 996–1003 (2007).
4. Okura, T., Nakata, Y., Yamabuki, K. & Tanaka, K. Regional Body Composition Changes Exhibit Opposing Effects on Coronary Heart Disease Risk Factors. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **24**, 923–929 (2004).
5. Larsson, B., Svardsudd, K. & Welin, L. Abdominal adipose tissue distribution, obesity, and risk of cardiovascular disease and death: 13 year follow up of participants in the study of men born in 1913. *Br. Med. J.* **288**, 1401–1404 (1984).
6. M., K. *et al.* The inflammatory characteristics of distinct abdominal adipose tissue depots are distinctively related to risk factors for cardiovascular disease. *Circulation* **128**, (2013).
7. Gil, A., Olza, J., Gil-Campos, M., Gomez-Llorente, C. & Aguilera, C. M. Is adipose tissue metabolically different at different sites? in *International Journal of Pediatric Obesity* **6**, 13–20 (2011).
8. Ibrahim, M. M. Subcutaneous and visceral adipose tissue: Structural and functional differences. *Obes. Rev.* **11**, 11–18 (2010).
9. Badimon, L. & Cubedo, J. Adipose tissue depots and inflammation: Effects on plasticity and resident mesenchymal stem cell function. *Cardiovasc. Res.* **113**, 1064–1073 (2017).
10. Esteve Ràfols, M. Adipose tissue: Cell heterogeneity and functional diversity. *Endocrinol. y Nutr. (English Ed.* **61**, 100–112 (2014).
11. Ledoux, S. *et al.* Angiogenesis associated with visceral and subcutaneous adipose tissue. *Diabetes* **57**, 3247–3257 (2008).
12. Koltzsch, M., Neumann, C., Kö, S. & Gerke, V. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol. Biol. Cell* **14**, 2372–2384 (2003).
13. Gimble, J. M., Katz, A. J. & Bunnell, B. a. Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circ. Res.* **100**, 1249–1260 (2007).
14. Schäffler, A. & Büchler, C. Concise Review: Adipose Tissue-Derived Stromal Cells-Basic and Clinical Implications for Novel Cell-Based Therapies. *Stem Cells* **25**, 818–827 (2007).
15. Cherubino, M., Rubin, J. P., Miljkovic, N., Kelmendi-Doko, A. & Marra, K. G. Adipose-derived stem cells for wound healing applications. *Ann. Plast. Surg.* **66**, 210–215 (2011).
16. Kang, T. *et al.* Adipose-Derives Stem Cells Induce Angiogenesis via

- Microvesicle Transport of miRNA-31. *Stem Cells Transl. Med.* **5**, 440–450 (2016).
17. Oñate, B. *et al.* The subcutaneous adipose tissue reservoir of functionally active stem cells is reduced in obese patients. *FASEB J.* **26**, 4327–4336 (2012).
 18. Pérez, L. M., Bernal, A., San Martín, N. & Gálvez, B. G. Obese-derived ASCs show impaired migration and angiogenesis properties. *Arch. Physiol. Biochem.* **119**, 195–201 (2013).
 19. Smitka, K. & Maresova, D. Adipose tissue as an endocrin organ: An update on pro-inflammatory and anti-inflammatory microenvironment. *Prague Medial Rep.* **116**, 87–111 (2015).
 20. Song, M. G. *et al.* Depot-specific differences in angiogenic capacity of adipose tissue in differential susceptibility to diet-induced obesity. *Mol. Metab.* **5**, 1113–1120 (2016).
 21. Wronska, A. & Kmiec, Z. Structural and biochemical characteristics of various white adipose tissue depots. *Acta Physiol.* **205**, 194–208 (2012).
 22. 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**, 348–357 (2015).
 23. Benjamin, E. J. *et al.* Heart Disease and Stroke Statistics—2018 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation* **137**, E67–E492 (2018).
 24. Kannel, W. B. & McGee, D. L. Diabetes and Cardiovascular Disease: The Framingham Study. *JAMA J. Am. Med. Assoc.* **241**, 2035–2038 (1979).
 25. Ray, I., Bhattacharya, A. & De, R. K. OCDD: An obesity and co-morbid disease database. *BioData Min.* **10**, (2017).
 26. WHO. *Obesity and overweight.* (2017).
 27. Dixit, V. D. Adipose-immune interactions during obesity and caloric restriction: reciprocal mechanisms regulating immunity and health span. *J. Leukoc. Biol.* **84**, 882–892 (2008).
 28. Mathieu, P., Lemieux, I. & Després, J. P. Obesity, inflammation, and cardiovascular risk. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* **87**, 407–416 (2010).
 29. Vilahur, G., Ben-Aicha, S. & Badimon, L. New insights into the role of adipose tissue in thrombosis. *Cardiovascular Research* **113**, 1046–1054 (2017).
 30. Lemoine, A. Y., Ledoux, S. & Larger, E. Adipose tissue angiogenesis in obesity. *Thromb. Haemost.* **110**, 661–669 (2013).
 31. Cai, J. *et al.* γ -secretase and presenilin mediate cleavage and phosphorylation of vascular endothelial growth factor receptor-1. *J. Biol. Chem.* **286**, 42514–42523 (2011).
 32. He, X., Cheng, R., Benyajati, S. & Ma, J. PEDF and its roles in physiological and pathological conditions: implication in diabetic and

- hypoxia-induced angiogenic diseases. *Clin. Sci.* **128**, 805–823 (2015).
33. Becerra, S. P. & Notario, V. The effects of PEDF on cancer biology: Mechanisms of action and therapeutic potential. *Nature Reviews Cancer* **13**, 258–271 (2013).
 34. Steinberg, G. R., Kemp, B. E. & Watt, M. J. Adipocyte triglyceride lipase expression in human obesity. **293**, E958–E964 (2007).
 35. Hosseinzadeh-Attar, M. J., Mahdavi-Mazdeh, M., Yaseri, M., Zahed, N. S. & Alipoor, E. Comparative Assessment of Serum Adipokines Zinc- α 2-glycoprotein and Adipose Triglyceride Lipase, and Cardiovascular Risk Factors Between Normal Weight and Obese Patients with Hemodialysis. *Arch. Med. Res.* **48**, 459–466 (2017).
 36. Mairal, a., Langin, D., Arner, P. & Hoffstedt, J. Human adipose triglyceride lipase (PNPLA2) is not regulated by obesity and exhibits low in vitro triglyceride hydrolase activity. *Diabetologia* **49**, 1629–1636 (2006).
 37. Mazaki-Tovi, S. *et al.* Characterization of visceral and subcutaneous adipose tissue transcriptome in pregnant women with and without spontaneous labor at term: Implication of alternative splicing in the metabolic adaptations of adipose tissue to parturition. *J. Perinat. Med.* **44**, 813–835 (2016).
 38. Peinado, J. R., Pardo, M., De la Rosa, O. & Malagón, M. M. Proteomic characterization of adipose tissue constituents, a necessary step for understanding adipose tissue complexity. *Proteomics* **12**, 607–620 (2012).
 39. Perez-Pérez, R. *et al.* Differential proteomics of omental and subcutaneous adipose tissue reflects their unlike biochemical and metabolic properties. *J. Proteome Res.* **8**, 1682–1693 (2009).
 40. Huang, H., Bhat, A., Woodnutt, G. & Lappe, R. Targeting the ANGPT-TIE2 pathway in malignancy. *Nat. Rev. Cancer* **10**, 575–585 (2010).
 41. Linares, P. M., Chaparro, M. & Gisbert, J. P. Angiopoietins in inflammation and their implication in the development of inflammatory bowel disease. A review. *J. Crohn's Colitis* **8**, 183–190 (2014).
 42. Abramovich, D. *et al.* Angiopoietins/TIE2 system and VEGF are involved in ovarian function in a DHEA rat model of polycystic ovary syndrome. *Endocrinology* **153**, 3446–3456 (2012).
 43. Penton, A. L., Leonard, L. D. & Spinner, N. B. Notch signaling in human development and disease. *Semin Cell Dev Biol.* **23**, 450–457 (2013).
 44. Henshall, T. L. *et al.* Notch3 is necessary for blood vessel integrity in the central nervous system. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **35**, 409–420 (2015).
 45. Pitulescu, M. E. *et al.* Dll4 and Notch signalling couples sprouting angiogenesis and artery formation. *Nat. Cell Biol.* **19**, 915–927 (2017).
 46. Niessen, K. & Karsan, a. Notch signaling in the developing cardiovascular system. *AJP Cell Physiol.* **293**, C1–C11 (2007).

47. Siekmann, A. F. & Lawson, N. D. Notch signalling and the regulation of angiogenesis. *Cell Adh. Migr.* **1**, 104–106 (2007).
48. Park, S., Sorenson, C. M. & Sheibani, N. PECAM-1 isoforms, eNOS and endoglin axis in regulation of angiogenesis. *Clin. Sci.* **129**, 217–234 (2015).
49. Sun, L. *et al.* Advanced glycation end products promote VEGF expression and thus choroidal neovascularization via Cyr61-PI3K/AKT signaling pathway. *Sci. Rep.* **7**, (2017).
50. Li, B. K. *et al.* Influence of suppression of CapG gene expression by siRNA on the growth and metastasis of human prostate cancer cells. *Genet. Mol. Res.* **14**, 15769–15778 (2015).
51. Silacci, P. *et al.* Gelsolin superfamily proteins: Key regulators of cellular functions. *Cell. Mol. Life Sci.* **61**, 2614–2623 (2004).
52. Turcot, V. *et al.* A polymorphism of the interferon-gamma-inducible protein 30 gene is associated with hyperglycemia in severely obese individuals. *Hum. Genet.* **131**, 57–66 (2012).
53. Benbow, J. H. *et al.* Diet-Induced Obesity Enhances Progression of Hepatocellular Carcinoma through Tenascin-C/Toll-Like Receptor 4 Signaling. *Am. J. Pathol.* **186**, 145–158 (2016).
54. Imanaka-Yoshida, K. & Aoki, H. Tenascin-C and mechanotransduction in the development and diseases of cardiovascular system. *Front. Physiol.* **5 JUL**, 1–12 (2014).
55. Fish, J. E. *et al.* miR-126 regulates angiogenic signaling and vascular integrity. *Dev. Cell* **15**, 272–84 (2008).
56. Fan, L., Wu, Q., Xing, X., Wei, Y. & Shao, Z. MicroRNA-145 targets vascular endothelial growth factor and inhibits invasion and metastasis of osteosarcoma cells. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*. **44**, 407–414 (2012).
57. Sessa, R. *et al.* The miR-126 regulates Angiopoietin-1 signaling and vessel maturation by targeting p85 β . *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1823**, 1925–1935 (2012).
58. Ren, S. *et al.* Microvesicles from human adipose stem cells promote wound healing by optimizing cellular functions via AKT and ERK signaling pathways 06 Biological Sciences 0601 Biochemistry and Cell Biology. *Stem Cell Res. Ther.* **10**, (2019).
59. Anderson, J. Mesenchymal stem cell-derived exosomes mediate angiogenesis. *J. Extracell. Vesicles* **4**, 33 (2015).

RESULTADOS

Table 1. Clinical characteristics of the study patients

Variables	nOB	OB
N	15	22
Age (Years)	40±4	39±2
Sex (M/W)	2/13	3/19
BMI (Kg/m²)	23.9±1.1	43.0±1.1
CVRF (N)	0	3
Smoking (%)	0	55
HT (%)	0	32
DM (%)	7	23
DLP (%)	0	50

nOB, non-obese. OB, Obese. CVRF's, cardiovascular risk factors. HTA, hypertension. DM, Diabetes Mellitus. DLP, Dyslipidemia. Values are expressed as mean ± SD or as percentages, when indicated.

RESULTADOS

Table 2. TaqMan gene expression assay probes used in the custom array

Gene symbol	Gene name	TaqMan Assay reference	Localization
AGER	Advanced glycosilation end product-specific receptor	Hs00153957_m1	Plasma membrane
ANGPT1	Angiopoietin 1	Hs00181613_m1	Extracellular
ANGPT2	Angiopoietin 2	Hs00169867_m1	Extracellular
CAPG	Macrophage-capping protein	Hs00156249_m1	Cytoplasm, Nucleus, Secreted
CD34	Hematopoietic progenitor cell antigen	Hs00156373_m1	Plasma membrane
CD68	Macrosialin	Hs00154355_m1	Plasma membrane
COL18A1	Collagen alpha-1(XVIII) chain	Hs00181017_m1	Extracellular
DLK1	Protein delta homolog 1	Hs00171584_m1	Plasma membrane
DLL4	Delta like protein-4	Hs00184092_m1	Plasma membrane
ENG	Endoglin	Hs00923996_m1	Plasma membrane
IFI30	Gamma-interferon-inducible lysosomal thiol reductase	Hs00173838_m1	Lysosome, extracellular region
NOTCH3	Neurogenic locus notch homolog protein3	Hs01128541_m1	Plasma membrane
PECAM1	Platelet endothelial cell adhesion molecule	Hs00169777_m1	Plasma membrane
PGF	Placenta growth factor	Hs00182176_m1	Extracellular
PLIN2	Perilipin2 (PLIN2)	Hs00605340_m1	Membrane, lipid droplets
PNPLA2	Patatin-like phospholipase domain-containing protein 2	Hs00386101_m1	Membrane, lipid droplets
PTX3	Pentraxin-related protein PTX3	Hs00173615_m1	Extracellular
SERPINF1	Pigment epithelium-derived factor	Hs01106937_m1	Extracellular
SPP1	Osteopontin	Hs00959010_m1	Extracellular
TEK	Angiopoietin-1 receptor	Hs00945155_m1	Plasma membrane, extracellular
TNC	Tenascin	Hs01115665_m1	Extracellular
VEGFA	Vascular endothelial growth factor A	Hs00900055_m1	Extracellular

Table 3. Differential genomic expression between the subcutaneous adipose tissue of patients and controls.

	P value	Ratio
AGER	0.001	1.75
ANGPT1	0.134	1.31
ANGPT2	0.094	1.39
CAPG	0.029	1.33
CD34	0.041	1.39
CD68	<0.001	2.13
COL18A1	0.417	0.93
DLL4	0.001	0.62
ENG	0.230	0.93
IFI30	<0.001	2.55
NOTCH3	0.005	1.70
PECAM1	0.416	0.88
PGF	0.944	1.02
PLIN2	0.002	0.67
PNPLA2	<0.001	0.62
PTX3	0.780	1.00
SERPINF1	0.939	1.04
SPP1	<0.001	4.76
TEK	0.104	0.83
TNC	0.183	1.12
VEGFA	<0.001	0.46

Red, down-regulated in patients p<0.05; green, up-regulated in patients p<0.05

RESULTADOS

Table 4. Differential genomic expression in SAT versus the VAT of obese patients with different number of CVRFs

Gene	Ratio	All patients N=22	cCRFs N=19	OB_nDM N=17	OB_DM N=5	OB_nDLP N=11	OB_DLP N=11	OB_nHT N=15	OB_HT N=7
AGER	0.85	0.072	0.184	0.193	0.138	0.051	0.534	0.140	0.176
ANGPT1	1.56	0.001	0.005	0.002	0.500	0.016	0.026	0.003	0.311
ANGPT2	1.73	0.011	0.009	0.013	0.500	0.374	0.013	0.027	0.176
CAPG	1.17	0.049	0.045	0.108	0.225	0.049	0.373	0.270	0.066
CD34	1.09	0.406	0.414	0.069	0.225	0.819	0.371	0.900	0.264
CD68	1.23	0.013	0.013	0.028	0.225	0.182	0.033	0.054	0.091
COL18A1	1.10	0.170	0.089	0.286	0.343	0.277	0.024	0.775	0.086
DLL4	1.30	0.053	0.070	0.042	0.893	0.497	0.029	0.016	0.828
ENG	1.20	0.055	0.081	0.087	0.345	0.289	0.110	0.105	0.243
IFI30	1.17	0.083	0.020	0.269	0.080	0.746	0.052	0.566	0.033
NOTCH3	3.98	<0.001	<0.001	<0.001	0.043	0.003	0.003	<0.001	0.018
PECAM1	1.52	0.002	0.006	0.006	0.225	0.062	0.016	0.004	0.176
PGF	0.83	0.072	0.091	0.084	0.686	0.051	0.594	0.100	0.866
PLIN2	1.15	0.143	0.382	0.280	0.686	0.073	0.825	0.226	0.428
PNPLA2	1.31	0.004	0.011	0.013	0.138	0.041	0.021	0.202	0.018
PTX3	1.11	0.046	0.108	0.050	0.500	0.013	0.657	0.088	0.237
SERPINF1	1.50	<0.001	<0.0001	<0.001	0.080	<0.001	0.004	0.002	0.018
SPP1	2.90	<0.001	0.003	0.003	0.225	0.021	0.016	0.001	0.237
TEK	1.24	0.029	0.031	0.050	0.500	0.213	0.086	0.128	0.145
TNC	3.03	<0.001	<0.001	<0.001	0.080	0.003	0.008	0.004	0.018
VEGFA	0.86	0.076	0.096	0.376	0.080	0.024	0.395	0.005	0.957

Red, upregulated in subcutaneous p<0.005; green, downregulated in subcutaneous p<0.05

RESULTADOS

Figure 1

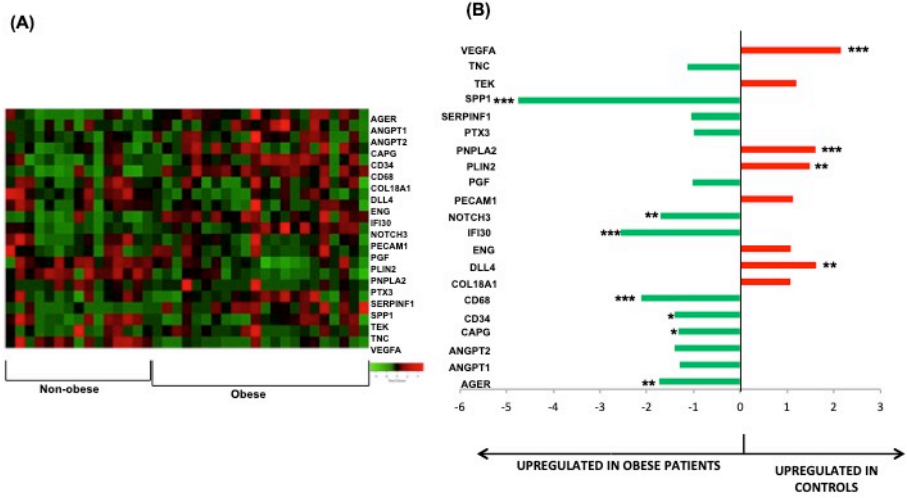


Figure 2

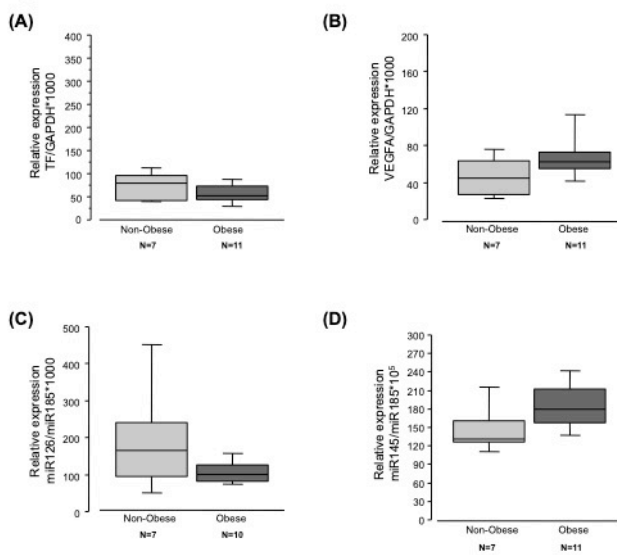


Figure 3

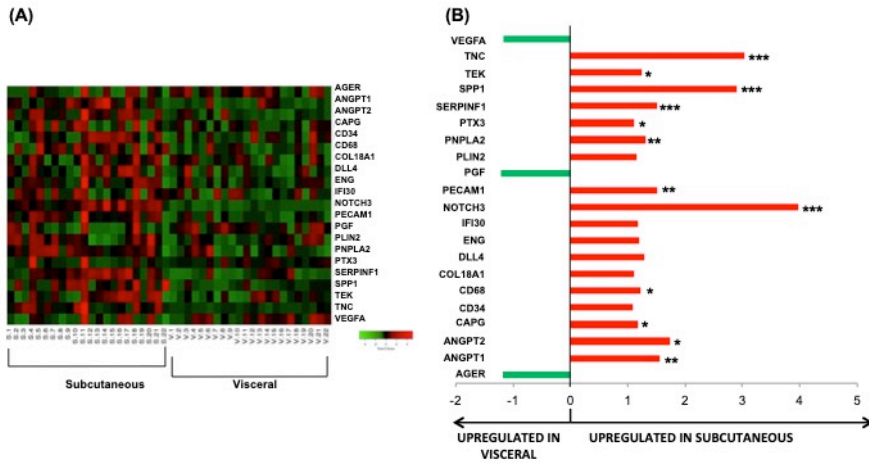
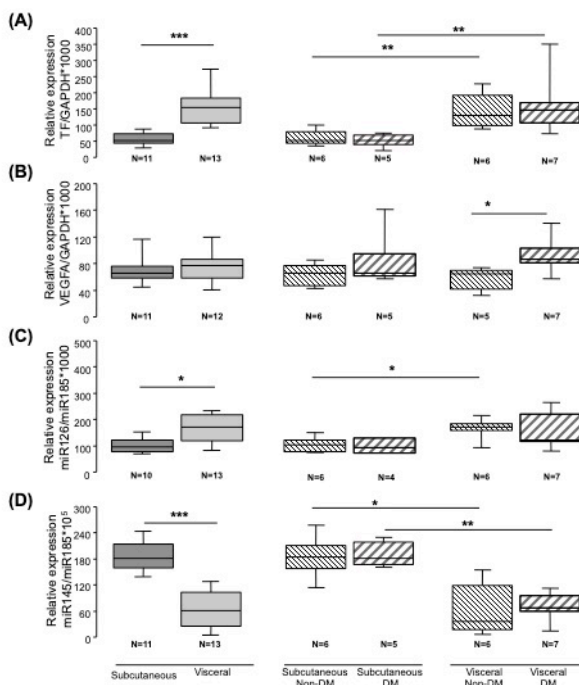


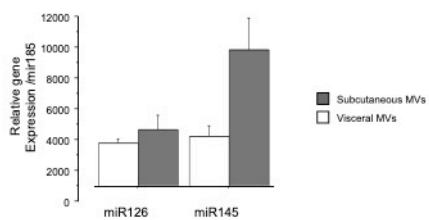
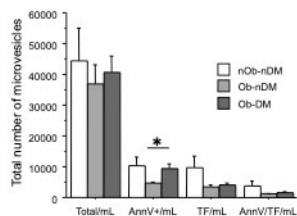
Figure 4



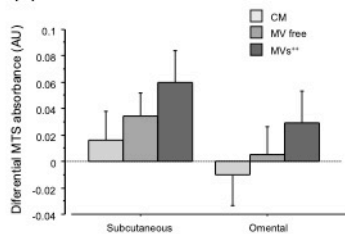
RESULTADOS

Figure 5

(A)



(C)



(D)

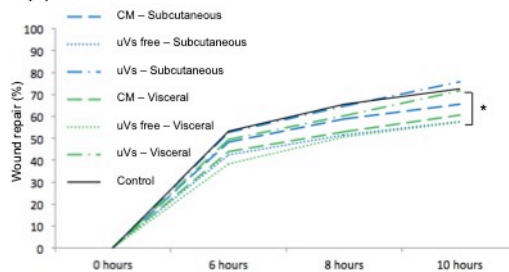


Figure 6

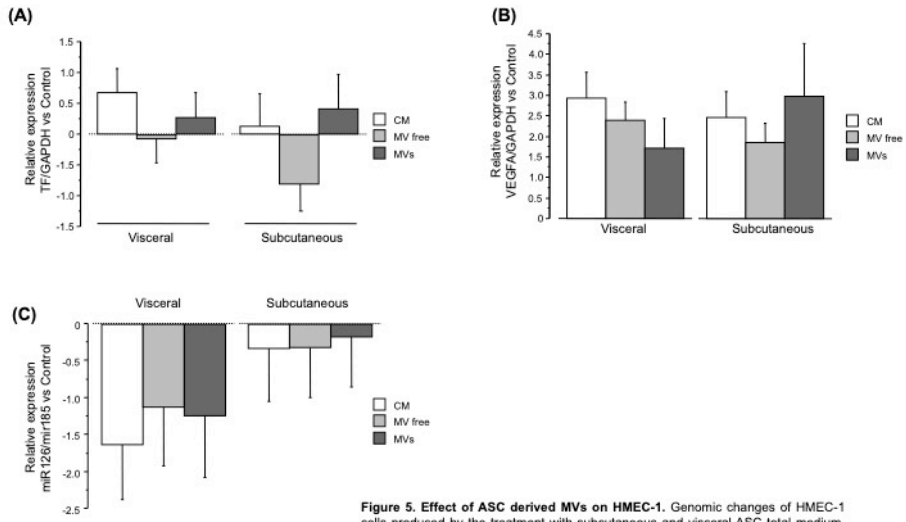


Figure 5. Effect of ASC derived MVs on HMEC-1. Genomic changes of HMEC-1 cells produced by the treatment with subcutaneous and visceral ASC total medium, MVs depleted medium or MVs rich medium. A) HMEC-1 TF gene expression. B) HMEC-1 VEGFA gene expression. C) HMEC-1 miR126 gene expression.

Figure 7

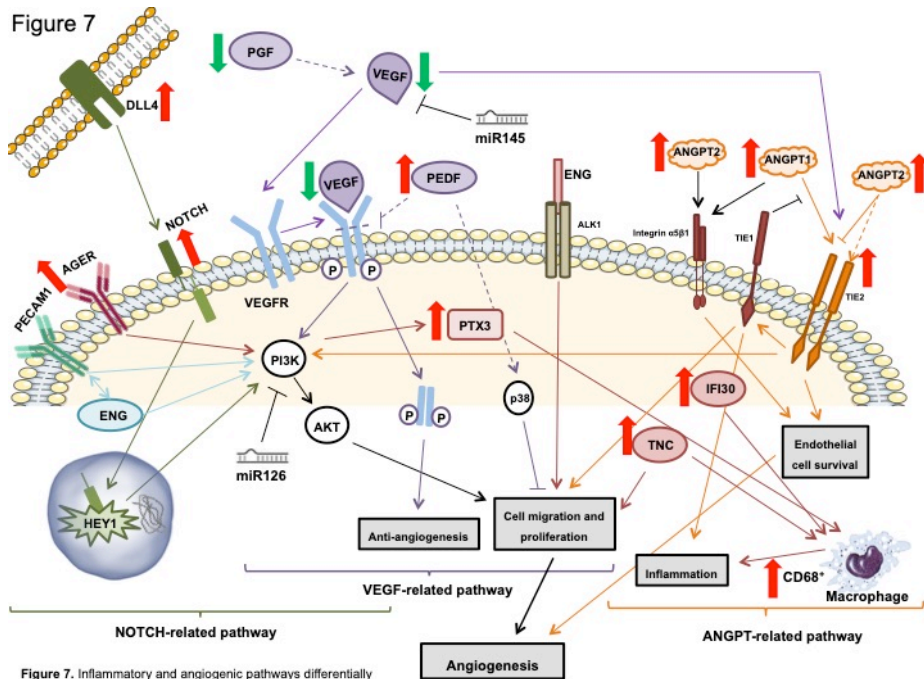


Figure 7. Inflammatory and angiogenic pathways differentially affected in SAT and VAT.

RESULTADOS

SUPPLEMENTAL MATERIAL

Supplemental Table 1. Gene expression profile of the subcutaneous and visceral adipose tissue of patients and controls

	Obese		Non-obese	
	Subcutaneous ($2^{\Delta\Delta CT}$)*1000	Visceral ($2^{\Delta\Delta CT}$)*1000	Subcutaneous ($2^{\Delta\Delta CT}$)*1000	Visceral ($2^{\Delta\Delta CT}$)*1000
AGER	7.05 ± 0.64	8.30 ± 0.48	4.03 ± 0.53	
ANGPT1	89.58 ± 9.17	52.7 ± 5.16	68.47 ± 5.30	
ANGPT2	15.35 ± 1.93	8.89 ± 0.92	11.01 ± 1.01	
CAPG	297.94 ± 24.63	254.41 ± 13.81	224.31 ± 16.15	
CD34	349.26 ± 28.80	320.7 ± 22.89	250.38 ± 27.62	
CD68	635.13 ± 41.73	515.71 ± 27.11	298.78 ± 49.20	
COL18A1	244.05 ± 17.61	220.96 ± 11.44	262.04 ± 17.95	
DLL4	36.47 ± 2.98	28.043 ± 2.52	59.22 ± 6.77	
ENG	354.15 ± 31.40	295.37 ± 13.72	382.82 ± 30.05	
IFI30	288.80 ± 28.28	246.45 ± 22.96	113.32 ± 24.85	
NOTCH3	337.38 ± 36.22	84.68 ± 6.18	198.90 ± 18.99	
PECAM1	497.34 ± 49.34	327.96 ± 21.81	562.18 ± 71.80	
PGF	6.82 ± 0.76	8.26 ± 0.48	6.67 ± 1.10	
PLIN2	297.58 ± 27.13	257.68 ± 14.46	442.55 ± 29.19	
PNPLA2	1084 ± 62.10	831.19 ± 70.16	1747.56 ± 11017	
PTX3	6.02 ± 2.37	5.44 ± 0.58	5.99 ± 1.39	
SERPINF1	2562.60 ± 170.68	1705.26 ± 126.53	2459.77 ± 184.53	
SPP1	238.56 ± 42.88	82.34 ± 12.96	50.08 ± 16.78	
TEK	65.82 ± 4.17	53.02 ± 3.24	79.95 ± 8.54	
TNC	38.79 ± 7.41	12.82 ± 1.11	34.56 ± 11.77	
VEGFA	198.17 ± 20.14	231.32 ± 13.68	426.72 ± 54.49	

Red, upregulated in subcutaneous p<0.005; green, downregulated in subcutaneous p<0.05

RESULTADOS

Supplemental Table 2. Gene expression of the adipose tissue from nDM and DM obese patients

Gene	SUBCUTANEOUS			VISCERAL			SUBCUTANEOUS			VISCERAL			Subcutaneous Vs Visceral			
	nDM	DM	nDM	DM	nDM	DM	P value	Ratio	P value	Ratio	P value	Ratio	P value	Ratio	P value	Ratio
AGER	7.12 ± 0.74	6.80 ± 1.37	8.31 ± 0.51	8.26 ± 1.36	0.906	0.95	0.969	0.99	0.193	0.86	0.138	0.82	0.138	0.82	0.138	0.82
ANGPT1	97.66 ± 10.79	62.12 ± 10.71	60.38 ± 6.46	46.66 ± 3.18	0.072	0.64	0.256	0.77	0.002	1.62	0.500	1.33	0.500	1.33	0.500	1.33
ANGPT2	16.52 ± 2.31	11.36 ± 2.91	8.89 ± 1.18	8.88 ± 0.70	0.127	0.69	0.411	1.00	0.013	1.86	0.500	1.28	0.500	1.28	0.500	1.28
CAPG	292.25 ± 26.21	317.30 ± 67.46	250.95 ± 14.53	266.19 ± 38.60	0.724	1.09	0.368	1.06	0.093	1.16	0.225	1.19	0.225	1.19	0.225	1.19
CD34	365.63 ± 32.28	293.59 ± 63.12	303.5 ± 21.35	379.19 ± 69.25	0.292	0.80	0.368	1.25	0.068	1.20	0.225	0.77	0.225	0.77	0.225	0.77
CD68	625.10 ± 44.51	669.24 ± 113.62	504.91 ± 28.68	552.45 ± 73.19	0.505	1.07	0.724	1.09	0.028	1.24	0.225	1.21	0.225	1.21	0.225	1.21
COL18A1	238.25 ± 17.62	263.75 ± 53.09	219.32 ± 12.09	226.53 ± 32.03	0.457	1.11	0.969	1.03	0.523	1.09	0.343	1.16	0.343	1.16	0.343	1.16
DLL4	38.23 ± 3.44	30.49 ± 5.73	27.26 ± 3.05	30.70 ± 4.28	0.255	0.80	0.368	1.13	0.019	1.40	0.893	0.99	0.893	0.99	0.893	0.99
ENG	347.79 ± 36.59	375.8 ± 66.43	283.80 ± 15.45	334.73 ± 24.48	0.092	1.08	0.092	1.18	0.084	1.23	0.345	1.12	0.345	1.12	0.345	1.12
IFI30	273.79 ± 26.54	339.84 ± 89.71	243.49 ± 26.54	256.51 ± 50.60	0.505	1.24	0.784	1.05	0.381	1.12	0.080	1.32	0.080	1.32	0.080	1.32
NOTCH3	329.73 ± 44.53	363.38 ± 55.81	84.78 ± 7.92	84.34 ± 5.46	0.327	1.10	0.906	0.99	<0.001	3.89	0.043	4.31	0.043	4.31	0.043	4.31
PECAM1	500.98 ± 57.45	484.94 ± 106.32	320.66 ± 26.01	352.78 ± 39.80	0.906	0.97	0.365	1.10	0.006	1.56	0.225	1.37	0.225	1.37	0.225	1.37
PGF	6.62 ± 0.72	7.51 ± 2.49	8.10 ± 0.54	8.80 ± 1.13	0.906	1.14	0.457	1.09	0.084	0.82	0.686	0.85	0.686	0.85	0.686	0.85
PLIN2	280.11 ± 25.91	356.97 ± 82.03	247.77 ± 13.05	291.36 ± 46.30	0.457	1.27	0.417	1.18	0.246	1.13	0.686	1.23	0.686	1.23	0.686	1.23
PNPLA2	1120.28 ± 54.25	964.90 ± 210.66	867.77 ± 86.72	706.82 ± 80.22	0.557	0.86	0.457	0.81	0.013	1.29	0.138	1.37	0.138	1.37	0.138	1.37
PTX3	6.47 ± 3.05	4.50 ± 1.78	5.32 ± 0.71	5.86 ± 0.88	0.611	0.69	0.411	1.10	0.050	1.22	0.500	0.77	0.500	0.77	0.500	0.77
SERPINF1	2715.24 ± 196.51	2043.64 ± 246.24	1782.30 ± 158.90	1443.35 ± 65.09	0.092	0.75	0.368	0.81	<0.001	1.52	0.080	1.42	0.080	1.42	0.080	1.42
SPP1	195.23 ± 31.68	385.85 ± 147.71	74.20 ± 15.87	110.02 ± 14.47	0.290	1.98	0.055	1.48	0.003	2.63	0.225	3.51	0.225	3.51	0.225	3.51
TEK	64.84 ± 4.79	69.15 ± 14.05	51.69 ± 4.09	57.54 ± 2.86	0.611	1.07	0.365	1.11	0.149	1.25	0.500	1.20	0.500	1.20	0.500	1.20
TNC	38.66 ± 9.10	39.25 ± 11.94	11.84 ± 1.08	16.14 ± 3.01	0.784	1.02	0.256	1.36	<0.001	3.26	0.080	2.43	0.080	2.43	0.080	2.43
VEGFA	205.44 ± 23.19	173.46 ± 43.11	222.89 ± 14.09	259.96 ± 36.80	0.667	0.84	0.290	1.17	0.084	0.92	0.080	0.67	0.080	0.67	0.080	0.67

RESULTADOS

Supplemental Table 3. Gene expression of the adipose tissue from nDLP and DLP obese patients

Gene	SUBCUTANEOUS		VISCERAL		SUBCUTANEOUS		VISCERAL		Subcutaneous Vs Visceral			
	nDLP	DLP	nDLP	DLP	P value	Ratio	P value	Ratio	OB_nDLP	OB_DLP		
AGER	6.38 ± 0.56	7.72 ± 1.14	8.58 ± 0.67	8.02 ± 0.71	0.375	0.83	0.718	1.07	0.051	0.74	0.534	0.96
ANGPT1	99.31 ± 10.92	79.85 ± 14.66	63.65 ± 9.4	50.87 ± 3.9	0.076	1.24	0.279	1.25	0.016	1.56	0.026	1.57
ANGPT2	12.22 ± 1.51	18.48 ± 3.39	9.71 ± 1.68	8.07 ± 0.75	0.178	0.66	0.622	1.20	0.374	1.26	0.013	2.29
CAPG	292.66 ± 33.87	303.23 ± 37.35	237.78 ± 19.61	271.04 ± 19.01	0.87	0.97	0.200	0.88	0.051	1.23	0.434	1.12
CD34	321.84 ± 30.3	376.67 ± 49.15	310.62 ± 37.44	330.78 ± 27.89	0.412	0.85	0.412	0.94	0.657	1.04	0.477	1.14
CD68	628.63 ± 54.92	641.63 ± 65.49	559.19 ± 45.88	472.23 ± 24.58	0.922	0.98	0.178	1.18	0.182	1.12	0.033	1.36
COL18A1	210.01 ± 12.87	278.09 ± 30.09	227 ± 17.77	214.93 ± 15.05	0.033	0.76	0.718	1.06	0.091	0.93	0.026	1.29
DLL4	31.37 ± 4.11	41.57 ± 3.9	26.63 ± 4.61	29.46 ± 2.24	0.061	0.75	0.158	0.90	0.374	1.18	0.033	1.41
ENG	309.31 ± 15.67	399 ± 59.1	284.18 ± 23.59	306.56 ± 14.45	0.123	0.78	0.450	0.93	0.424	1.09	0.062	1.30
IFI30	281.41 ± 33.01	296.18 ± 47.51	271.26 ± 36.59	221.64 ± 27.42	0.768	0.95	0.309	1.22	0.722	1.04	0.062	1.34
NOTCH3	264.52 ± 23.1	410.23 ± 62.56	81.19 ± 9.96	88.18 ± 7.67	0.071	0.64	0.622	0.92	0.003	3.26	0.003	4.65
PECAM1	439.63 ± 27.2	555.04 ± 93.92	340.81 ± 38.92	315.11 ± 21.21	0.450	0.79	0.818	1.08	0.062	1.29	0.016	1.76
PGF	5.54 ± 0.61	8.1 ± 1.32	8.1 ± 0.69	8.42 ± 0.7	0.123	0.68	0.670	0.96	0.051	0.68	0.594	0.96
PLIN2	316.24 ± 39.11	278.91 ± 38.62	245.07 ± 20.76	270.29 ± 20.37	0.870	1.13	0.279	0.91	0.110	1.29	0.722	1.03
PNPLA2	1165.41 ± 81.6	1004.53 ± 90.79	843.06 ± 118.89	819.32 ± 80.7	0.341	1.16	0.718	1.03	0.041	1.38	0.021	1.23
PTX3	2.66 ± 0.67	9.38 ± 4.58	5.47 ± 0.96	5.42 ± 0.7	0.622	0.28	0.870	1.01	0.013	0.49	0.657	1.73
SERPINF1	2573.44 ± 235.73	2551.76 ± 258.39	1747.51 ± 231.96	1663.02 ± 114.38	0.974	1.01	0.533	1.05	<0.001	1.47	0.004	1.53
SPP1	190.05 ± 37.93	287.06 ± 76.25	74.67 ± 19.25	90.01 ± 17.98	0.622	0.66	0.341	0.83	0.021	2.55	0.016	3.19
TEK	62.71 ± 5.92	68.93 ± 7.51	53.57 ± 5.72	52.47 ± 3.34	0.450	0.91	0.870	1.02	0.286	1.17	0.155	1.31
TNC	30.96 ± 6.72	46.62 ± 13.16	11.83 ± 1.11	13.8 ± 1.94	0.412	0.66	0.768	0.86	0.003	2.62	0.008	3.38
VEGFA	194.1 ± 21.6	202.24 ± 35.12	230.42 ± 24.19	232.22 ± 14.15	0.768	0.96	0.670	0.99	0.062	0.84	0.213	0.87

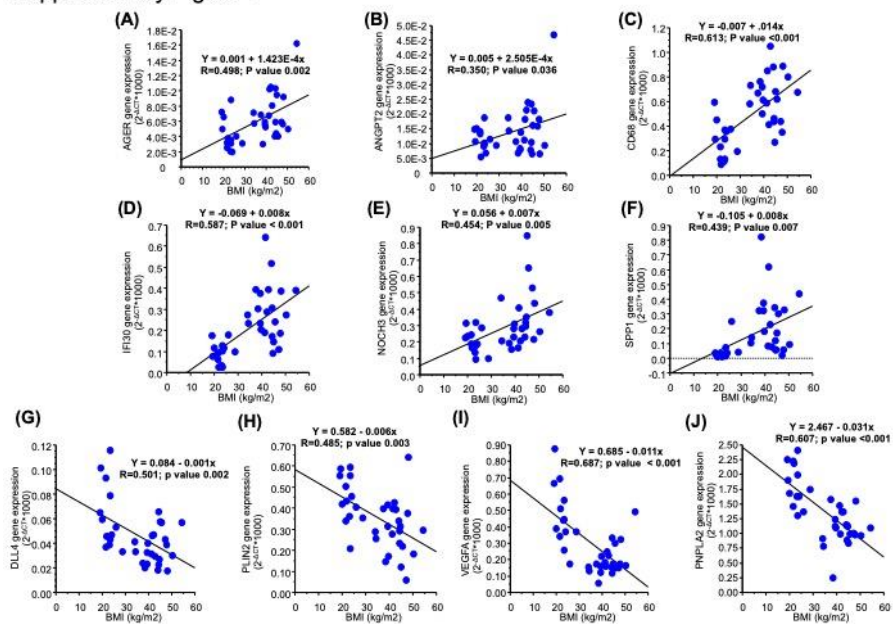
RESULTADOS

Supplemental Table 4. Gene expression of the adipose tissue from nHT and HT obese patients

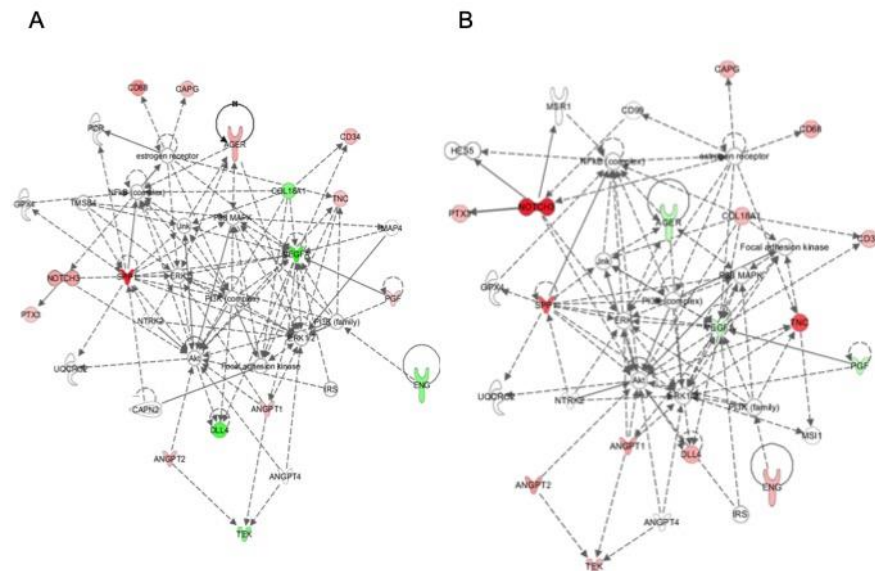
Gene	SUBCUTANEOUS			VISCERAL			SUBCUTANEOUS			VISCERAL			Subcutaneous Vs Visceral			
	nHT	HT	nHT	nHT	HT	nHT	P value	Ratio	P value	Ratio	P value	Ratio	OB_nHTA	P value	Ratio	OB_HTA
AGER	6.89±0.63	7.4±1.57	7.99±0.6	8.61±0.77	8.61±0.77	8.61±0.77	0.860	0.93	0.698	0.93	0.140	0.86	0.140	0.86	0.176	0.86
ANGPT1	101.59±9.99	77.58±14.98	62.55±9.53	51.96±3.91	51.96±3.91	51.96±3.91	0.007	1.20	0.972	1.31	0.003	1.62	0.003	1.62	0.311	1.49
ANGPT2	13.22±1.71	17.48±3.44	9.02±1.55	8.76±1.07	8.76±1.07	8.76±1.07	0.459	1.03	0.459	0.76	0.027	1.46	0.027	1.46	0.176	2.00
CAPG	303.05±33.52	292.84±37.67	253.76±19.66	255.06±20.36	255.06±20.36	255.06±20.36	0.597	0.99	0.459	1.03	0.281	1.19	0.281	1.19	0.063	1.15
CD34	330.51±28.51	368±51	321.63±35.65	319.77±30.48	319.77±30.48	319.77±30.48	0.805	1.01	0.062	0.90	0.691	1.03	0.691	1.03	0.311	1.15
CD68	626.47±55.72	643.79±64.76	573.5±41.87	457.92±25.82	457.92±25.82	457.92±25.82	0.647	1.25	0.217	0.97	0.054	1.09	0.054	1.09	0.091	1.41
COL18A1	220.47±17.25	267.62±29.9	229.86±18.38	212.06±14	212.06±14	212.06±14	0.459	1.08	0.549	0.82	0.776	0.96	0.776	0.96	0.063	1.26
DLL4	33.57±4.23	39.37±4.22	22.81±2.82	33.28±3.64	33.28±3.64	33.28±3.64	0.805	0.69	0.045	0.85	0.020	1.47	0.020	1.47	0.612	1.18
ENG	312.04±16.8	396.27±59.19	268.59±18.91	322.16±17.01	322.16±17.01	322.16±17.01	0.148	0.83	0.053	0.79	0.125	1.16	0.125	1.16	0.237	1.23
IFI30	279.69±32.93	297.91±47.51	287.02±34.88	205.87±25.85	205.87±25.85	205.87±25.85	0.418	1.39	0.148	0.94	0.609	0.97	0.609	0.97	0.028	1.45
NOTCH3	254.68±22.97	420.08±60.11	73.13±8.24	96.24±8.12	96.24±8.12	96.24±8.12	0.113	0.76	0.459	0.61	<0.001	3.48	<0.001	3.48	0.018	4.36
PECAM1	465.39±34.97	529.29±93.8	322.51±35.39	333.4±27.18	333.4±27.18	333.4±27.18	0.751	0.97	0.307	0.88	0.004	1.44	0.004	1.44	0.176	1.59
PGF	6.1±0.78	7.54±1.31	8.4±0.81	8.12±0.54	8.12±0.54	8.12±0.54	0.098	1.03	0.972	0.81	0.100	0.73	0.100	0.73	0.866	0.93
PLIN2	333.73±39.39	261.42±35.75	256.82±22.75	258.53±18.97	258.53±18.97	258.53±18.97	0.698	0.99	0.192	1.28	0.212	1.30	0.212	1.30	0.043	1.01
PNPLA2	1209.45±77.95	960.49±83.78	862.61±123.57	799.77±72.16	799.77±72.16	799.77±72.16	0.698	1.08	0.307	1.26	0.202	1.40	0.202	1.40	0.018	1.20
PTX3	6±3.45	6.05±3.43	5.33±0.98	5.56±0.67	5.56±0.67	5.56±0.67	0.148	0.96	0.698	0.99	0.088	1.12	0.088	1.12	0.237	1.09
SERPINF1	2671.73±211.38	2453.48±274.4	1781.31±226.49	1629.22±121.6	1629.22±121.6	1629.22±121.6	0.275	1.09	0.698	1.09	0.002	1.50	0.002	1.50	0.018	1.51
SPP1	205.37±35.63	271.74±78.96	60.24±12.02	104.44±21.53	104.44±21.53	104.44±21.53	0.459	0.58	0.140	0.76	0.001	3.41	0.001	3.41	0.237	2.60
TEK	65.64±5.8	66±7.72	51.64±5.86	54.41±3.05	54.41±3.05	54.41±3.05	0.751	0.95	0.378	0.99	0.173	1.27	0.173	1.27	0.311	1.21
TNC	29.88±6.21	47.7±13.28	11.25±1.04	14.39±1.9	14.39±1.9	14.39±1.9	0.032	0.78	0.418	0.63	0.004	2.66	0.004	2.66	0.018	3.32
VEGFA	206.1±20.72	190.24±35.52	238.96±23.92	223.68±14.22	223.68±14.22	223.68±14.22	0.805	1.07	0.916	1.08	0.008	0.86	0.008	0.86	0.735	0.85

RESULTADOS

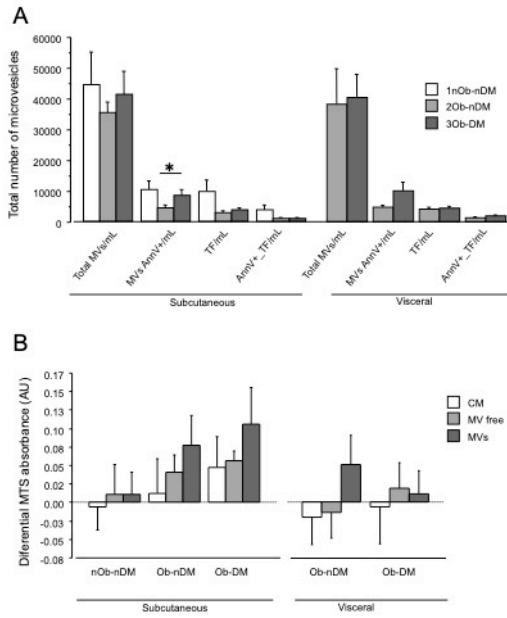
Supplementary Figure 1



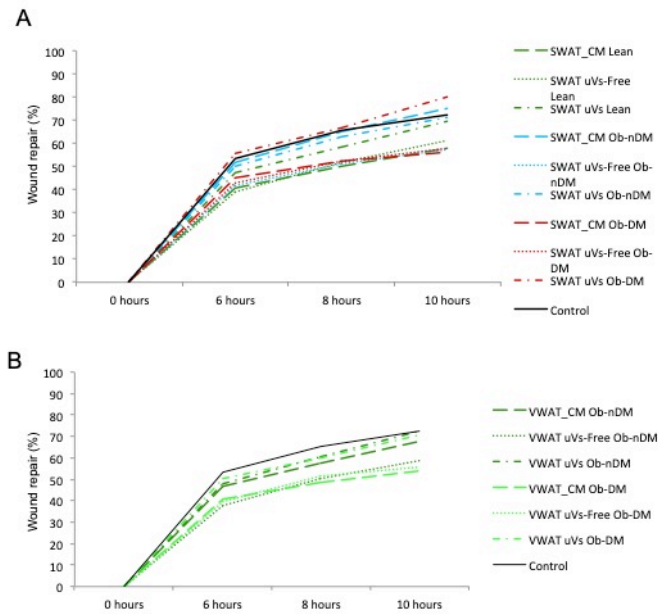
Supplementary Figure 2



Supplementary Figure 3



Supplementary Figure 4



DISCUSIÓN

La enfermedad cardiovascular (ECV) es, junto con el cáncer, la principal causa de mortalidad tanto en países desarrollados, como en países en vías de desarrollo (WHO, 2016). El envejecimiento de la población, así como los cambios en el estilo de vida y la pérdida de los denominados “hábitos cardiosaludables”, han llevado a aumentar cada año la incidencia de las diversas ECVs (Bertomeu & Castillo-Castillo, 2008).

La etiología de las ECVs es multifactorial y compleja, ya que intervienen factores tanto ambientales como genéticos, que en la mayoría de los casos suelen presentarse asociados entre sí. Aparecen así los denominados “Factores de Riesgo Cardiovascular”, que permiten estimar la probabilidad de un individuo de sufrir un evento cardiovascular, así como prevenir su aparición. En esta tesis nos centraremos en los factores de riesgo modificables, es decir, aquellos que podemos evitar (Banegas et al., 2006).

Por tanto, la búsqueda de mecanismos que ayuden a la prevención, evitando así el desarrollo de una enfermedad cardiovascular, así como permitiendo una mejora en la salud de un individuo, sigue teniendo gran importancia en la investigación, no solo en la ECV, sino en cualquier otra patología.

Además, el papel del tejido adiposo como protagonista principal en el desarrollo de enfermedades metabólicas, como la obesidad y la diabetes, importantes factores de riesgo cardiovascular, así como su función como principal reservorio de células mesenquimales del organismo, han llevado a que en los últimos años gran parte de las investigaciones se hayan centrado en este tejido.

Los trabajos que forman parte de esta tesis se centran en la prevención cardiovascular, investigando posibles intervenciones nutricionales que ayuden a reducir los factores de riesgo cardiovascular de un individuo,

principalmente la dislipemia, la obesidad y la diabetes. Además, se estudia la composición de diferentes depósitos de tejido adiposo, con el fin de buscar posibles marcadores que nos ayuden a prevenir la ECV. Por último, se estudia el papel de las células madre derivadas de tejido adiposo (ASC), así como las microvesículas extracelulares que estas células secretan al medio, como potenciales mediadores en el proceso de regeneración cardíaca.

En esta tesis doctoral se estudia primero, mediante técnicas proteómicas aplicadas a diferentes muestras de suero y plasma humano, el papel nutricional de diferentes compuestos naturales como son, los ácidos grasos omega-3, los fitoesteroles (PhyS) y el pinitol, en la prevención de la obesidad y la diabetes. Para ello se utilizan diferentes cohortes de voluntarios con diferentes factores de riesgo, pero que no habían sufrido previamente un evento cardiovascular.

El consumo de azúcares en las dietas puede deberse al consumo de alimentos en los que el azúcar es uno de los componentes principales, como puede ser el caso de las frutas (fructosa) o la leche (lactosa), o alimentos en los que se adiciona el azúcar (azúcares añadidos), como son las bebidas edulcoradas, zumos, caramelos, tartas, galletas, helados, entre otros. Según datos de la sociedad americana del corazón (AHA, del inglés, *American Heart Association*), el consumo máximo de azúcar en mujeres debería ser de 100 calorías al día y de 150 calorías al día en hombres. Sin embargo, el consumo medio de azúcar en EEUU durante los años 2001 y 2004, ascendía a más de 350 calorías al día, llegando a superar la 500 calorías de azúcar al día en individuos de entre 14 y 18 años, y siendo las bebidas edulcoradas la principal fuente de azúcar en la dieta (Johnson et al., 2009). La relación entre las dietas con un alto índice glicémico y el desarrollo de problemas metabólicos como la resistencia a la insulina, la diabetes y el sobrepeso u obesidad ha sido ampliamente estudiado, siendo la reducción de los niveles de glucosa uno de los principales

mecanismos de prevención y tratamiento de la diabetes (Hodge, English, O’Dea, & Giles, 2004; Macdonald, 2016).

Los poli-alcoholes han emergido en la actualidad como un buen sustituto de los azúcares, debido a su potencial antidiabético (Derosa, Limas, Maciás, Estrella, & Maffioli, 2014). Entre estos alcoholes encontramos el Pinitol (3-O-methyl-D-chiro-inositol), cuyo papel en el control glicémico ha sido previamente estudiado (Bañuls et al., 2016; Davis et al., 2000). En esta tesis hemos visto como, la sustitución de el azúcar refinado con un edulcorante a base de Pinitol, ayuda a mejorar el metabolismo de la glucosa en individuos con intolerancia a la glucosa, así como en un modelo de rata diabético. Se observó el cambio en la expresión proteica de IGF1BP-ALS y el complemento C4A, proteínas implicadas en la protección de las células β pancreáticas (Kingery, Wu, Zhou, Hoffman, & Yu, 2012; Thankamony et al., 2014). Esto es de gran importancia ya que, los pacientes diabéticos, se caracterizan por haber perdido alrededor del 80% de las células β , principal reservorio de insulina del organismo (Cnop et al., 2005). Además, también se observó el aumento de los niveles del transportador de glucosa 2 (GLUT2), que favorece la secreción de glucosa de las células β tras la ingesta de nutrientes, reduciendo así los niveles de glucosa en sangre (Tobin et al., 2008).

El sobrepeso, y en mayor medida la obesidad, son uno de los principales desencadenantes de la resistencia a la insulina, pudiendo desembocar en una enfermedad diabética si esta no es controlada.

Por ello es necesario, no solo buscar estrategias que mejoren el pronóstico de pacientes diabéticos o intolerantes a la glucosa, sino también el estudio de mecanismos que ayuden a prevenir la obesidad, o al menos a reducir los efectos deletéreos que esta produce, con el fin de prevenir un problema metabólico mayor.

Por ello en esta tesis, se realizó también un estudio longitudinal en pacientes con sobrepeso, al ser su dieta suplementada con ácidos

grasos omega 3 y fitoesteroles, para ver como estos nutrientes afectaban a su metabolismo.

Los resultados obtenidos muestran que en pacientes con sobrepeso, la ingesta de una bebida suplementada con omega-3, produce una mejora en las vías relacionadas con el metabolismo lipídico mediante el aumento de diferentes proteínas, incluyendo la Apo-E, Apo-A1, Apo-D, Apo-L1, LCAT y PON-1. En cambio, al ingerir estos mismos voluntarios con sobrepeso, bebidas suplementadas con fitoesteroles, se produce una reducción del perfil inflamatorio de estos individuos, mediante la regulación de diferentes moléculas, incluyendo SAP y CCL2.

Los efectos beneficiosos de los ácidos grasos omega-3 han sido ampliamente estudiados. En 1976, Bang *et al.* publicaron un estudio demostrando los efectos cardioprotectores de la dieta de los esquimales, debido a su alto contenido en ácidos grasos poli-insaturados (Bang, Dyerberg, & Hjørne, 1976), pero no fue hasta 1986, cuando Keys *et al.* realizaron un estudio transversal, en el que incluyeron individuos de 7 países diferentes, poniendo en manifiesto el papel beneficioso de las dietas japonesa y mediterránea, ambas ricas en omega-3, y su papel protector ante la aparición de enfermedades cardiovasculares (Keys et al., 1986). Actualmente, sabemos que los ácidos grasos saturados tienen un efecto dañino en la salud, sin embargo, los ácidos grasos mono-insaturados y poli-insaturados ejercen un efecto protector (Calder, 2015). Además, los ácidos grasos omega-3 en particular, son reconocidos por sus múltiples efectos beneficiosos, no sólo en la enfermedad cardiovascular, sino en otras muchas patologías, incluyendo el cáncer (Jing, K., Wu, T., Lim, 2013), enfermedad reumática (Akbar, Yang, Kurian, & Mohan, 2017), y la epilepsia (Tejada et al., 2016) entre otras.

La relación de los ácidos grasos Omega-3 con el metabolismo lipídico, aunque previamente estudiado, ofrecía resultados algo ambiguos (Pizzini et al., 2017), por lo que la necesidad de seguir investigando en este campo era clara. Los cambios proteómicos observados tras la ingesta de leche suplementada con omega-3 ponen en manifiesto la estrecha relación entre este ácido graso poli-insaturado y el metabolismo lipídico.

El papel protector de las HDL ha sido ampliamente estudiado, sin embargo, cada vez es más aceptado el hecho de que la importancia de las HDL radica, no en la cantidad, sino en la calidad (composición, funcionalidad...) de estas moléculas (L. Badimon & Vilahur, 2014; L. Badimon, Vilahur, & Cubedo, 2016). El principal componente de las HDL es la apolipoproteína A-1 (Apo-A1), correspondiendo a un 70% del contenido proteico total y jugando un papel fundamental en el transporte reverso del colesterol (Cubedo, Padro, & Badimon, 2014). Además, encontramos la enzima LCAT (Lecitin Colesterol Acil Transferasa), aumentada tras la ingesta de leche rica en omega-3, y que posee un papel esencial en el proceso de esterificación del colesterol, aunque necesita la acción de otras moléculas para ser activado (Trajkovska & Topuzovska, 2017). Apo-A1 y Apo-E son los principales activadores de la enzima LCAT. Por su parte, la enzima anti-oxidante PON-1 (Paraoxonase-1), es el principal estabilizador de LCAT, previniendo así su inactivación (Pizzini et al., 2017). Por tanto, una acción coordinada de, al menos, estas cuatro moléculas, es necesaria para un correcto funcionamiento del metabolismo lipídico.

Además de la importante relación entre la obesidad y el metabolismo lipídico, existe también un estado de inflamación crónico asociado a la obesidad, dando lugar así a un aumento del riesgo cardiovascular. Los fitoesteroles son compuestos naturales, de origen vegetal, que poseen una estructura similar al colesterol pero que no pueden ser

sintetizados por el ser humano, sino que ha de ser ingerido a través de la dieta. Debido a su similitud al colesterol, los fitoesteroles son capaces de bloquear la absorción de este, reduciendo así los niveles de colesterol en sangre (Jones, MacDougall, Ntanios, & Vanstone, 2011). Sin embargo, el papel protector de estos esteroides va más allá de la reducción del colesterol, jugando también un importante papel anti-inflamatorio en el organismo (Rocha et al., 2016). De hecho, en esta tesis demostramos el papel de los fitoesteroides en la atenuación de las vías inflamatorias en voluntarios sanos con sobrepeso, mediante la reducción de la pentraxina SAP (del inglés, Serum amyloid P), así como el aumento de la quemoquina CCL2 (del inglés C-C motif chemokine-2), ambas implicadas en el proceso inflamatorio. Las pentraxinas, y más en concreto SAP, han sido ampliamente relacionadas, no sólo con el proceso aterosclerótico, sino también con los procesos de fibrosis, coagulación e inflamación. En concreto, se sabe que las pentraxinas son uno de los principales efectores del proceso de inflamación crónica asociado a la obesidad (Du Clos, 2013; Vilahur & Badimon, 2015). Al igual que SAP, la quemoquina CCL2 también está implicada en los procesos de inflamación crónica relacionados con la obesidad, de hecho, los niveles de CCL2 se encuentran aumentados, no solo en el tejido adiposo de pacientes obesos, sino también en las muestras de suero de estos individuos (Panee, 2012).

Por tanto, los cambios observados en el perfil proteico de los voluntarios de estudio, corroboran la importancia de reducir los niveles de azúcar ingeridos, principalmente en pacientes con intolerancia a la glucosa, sustituyendo las fuentes comunes de azúcar, por un edulcorante natural rico en pinitol. Además, se incide de nuevo en el beneficioso efecto de los ácidos grasos omega-3 y los fitoesteroides, en la reducción del riesgo cardiovascular de individuos con sobrepeso, planteando una forma sencilla y segura de incluir estos compuestos

en las dietas actuales, cada vez más alejadas de la tradicional dieta mediterránea.

Como hemos revisado, la obesidad está asociada a un estado crónico de inflamación, en el que el tejido adiposo, y las adipoquinas que este contiene, adquieren gran importancia. El tejido adiposo blanco está ampliamente distribuido por todo el organismo, pudiendo diferenciarse dos tipos diferentes de grasa, la grasa visceral y la subcutánea. Por ello, en esta tesis se ha realizado un estudio tanto proteómico como genómico de diferentes depósitos de grasa en individuos sanos con obesidad. Además, también se ha realizado el estudio de las células madre derivadas del tejido adiposo y de las partículas extracelulares secretadas por este, y su papel en el desarrollo de la patología cardiovascular.

El tejido adiposo visceral (TA-V) es un tejido metabólicamente más activo que el tejido adiposo subcutáneo (TA-S) (Ibrahim, 2010), hecho que queda corroborado en esta tesis, donde mediante una aproximación proteómica inicial, observamos que, el TA-V de los pacientes obesos, poseía una mayor expresión de proteínas de oxidación, coagulación e inflamación, que el TA-S de estos mismos pacientes. Además, también observamos que, como resultado de la presencia de diabetes, el TA-V sufría modificaciones relacionadas con las enfermedades metabólicas, mientras que el TA-S estaba principalmente relacionado con el sistema endocrino.

Una vez establecida la relación entre los diferentes depósitos de grasa con la obesidad y la diabetes con estudios proteómicos, que siguen en desarrollo en nuestro grupo, estudiamos la transcriptómica de estos tejidos en relación al desarrollo de la patología cardiovascular. El tejido adiposo está altamente vascularizado (Lemoine et al., 2013) y junto con los diferentes grupos celulares que lo componen, íntimamente relacionado con el proceso de angiogénesis (Bora & Majumdar, 2017; Zhao, Johnson, & Liu, 2017). Por ello, a continuación

realizamos un análisis transcriptómico, para analizar el potencial angiogénico e inflamatorio de los diferentes depósitos de grasa, y su relación con la presencia de diferentes factores de riesgo cardiovascular. Aunque la vía del VEGF (del inglés, *vascular endothelial growth factor*) sea, probablemente, la vía más estudiada en relación al proceso de angiogénesis (Matsumoto & Ema, 2014; Testa, Pannitteri, & Condorelli, 2008), existen multitud de moléculas y mecanismos por los que la formación del vaso tiene lugar, destacando, además del VEGF, la vía de NOTCH y la vía de las angiopietinas (Caporarello et al., 2017). Al comparar el TA-S de voluntarios con peso normal y voluntarios obesos, vimos que, aunque el VEGFA está aumentado en el TA-S de los individuos de peso normal, los pacientes con sobrepeso tienen activada la vía de las angiopietinas. En cuanto a la vía de NOTCH, aunque los pacientes obesos tienen mayores niveles de NOTCH3, los voluntarios con normo-peso tienen aumentado el receptor DLL4, uno de los principales ligandos de esta vía. Por tanto, aunque claramente la obesidad afecta a NOTCH, sería necesario estudiar en profundidad todas las moléculas (NOTCH 1-4) y receptores (DLL1, DLL3, DLL4, JAGGED1 and JAGGED2) implicadas en esta vía (Liu, Fan, Wang, Zheng, & Lu, 2014).

Para incidir en la importancia de la obesidad en la composición y comportamiento del TA-S, observamos también como existe una linealidad entre la expresión de los diferentes genes analizados con el índice de masa corporal de los diferentes voluntarios. Sin embargo, pese a los cambios observados en el TA-S debidos a la obesidad, al estudiar las células madre derivadas de este TA-S (sASC), no vimos ningún cambio significativo en los genes analizados, tan solo una tendencia a disminuir el nivel del miRNA-145 en las sASC provenientes de voluntarios no obesos. La inhibición de miR-145 esta relacionada con la vía del VEGF, produciendo un mayor potencial

angiogénico, al favorecer la migración y proliferación celular (Arderiu et al., 2019).

Comparamos la expresión de diferentes genes involucrados en angiogénesis e inflamación entre en TA-S y el TA-V de estos pacientes obesos sometidos a cirugía de by-pass gástrico, observando una mayor expresión génica general en el TA-S, lo cual corrobora la hipótesis de que el tejido TA-S es un tejido protector, mientras que el TA-V es mucho más perjudicial (Antonopoulos & Tousoulis, 2017; Mandviwala, Khalid, & Deswal, 2016). De nuevo observamos que, en el TA-S de pacientes obesos, la expresión de VEGFA está disminuida en comparación con su TA-V, sin embargo esta reducción no llega a ser significativa. VEGFA y ANGPT1 poseen una función en parte complementaria, ya que ambos ayudan a la fosforilación de TIE2, que ayuda a mantener la homeostasis endotelial (Linares, Chaparro, & Gisbert, 2014), pero además, la vía de la ANGPT-TIE2, aumentada en el TA-S, relaciona la vía inflamatoria y la angiogénica (Huang, Bhat, Woodnutt, & Lappe, 2010). En este caso, la vía de NOTCH, por medio de su receptor NOTCH3 y del ligando DLL4, también aparece aumentada en el TA-S de los voluntarios obesos comparado con el TA-V, al igual que otras múltiples moléculas y factores de crecimiento incluyendo PECAM1 (del inglés, *Platelet endothelial cell adhesion molecule-1*), ENG (Endoglina), AGER (del inglés, *Advanced glycation end-product specific receptor*) y CAPG (del inglés, *Capping actin protein*). Es importante observar que, cuando analizamos los pacientes que además de obesidad, sufren diabetes mellitus tipo 2, todos estos cambios observados desaparecen, y tan solo NOTCH3 aparece aumentado en el TA-S. Por tanto, se reafirma el doble papel protector y patógeno de la obesidad, dependiendo de la localización del TA, así como de las comorbilidades que le acompañen (Orio et al., 2016; Sangrós et al., 2018).

El tejido adiposo es un tejido complejo, formado por multitud de moléculas y grupos celulares, entre los que se encuentran las células madre derivadas del tejido adiposo (ASC). Analizamos también estas ASC derivadas tanto de grasa subcutánea (sASC) como visceral (vASC), y descubrimos un aumento significativo de las moléculas pro-angiogénicas TF (Arderiu, Peña, Aledo, Juan-Babot, & Badimon, 2011) y miR-126 (Fish et al., 2008) en las vASC. Del mismo modo, el microRNA miR-145, potente inhibidor del proceso de angiogénesis, mediante el bloqueo de la vía del VEGF (Fan, Wu, Xing, Wei, & Shao, 2012), aparece disminuido en las vASC, comparado con las sASC, aunque el VEGFA aparece inalterado. Estos resultados concuerdan con el perfil angiogénico observado en el tejido adiposo total, ya que también el VEGFA disminuía en el TA-S, aunque sin alcanzar la significatividad. Sin embargo, al contrario de lo observado en la grasa total, los cambios observados en las ASC son independientes de la presencia de diabetes mellitus.

Las células madre han sido ampliamente estudiadas en el campo de la medicina regenerativa, incluyendo la regeneración cardíaca (Bayes-Genis, Gálvez-Montón, Prat-Vidal, & Soler-Botija, 2013), sin embargo, pese a los avances obtenidos, sigue si ser una terapia aceptada en la mayoría de los tratamientos, no sólo por el componente ético que acarrearán, sino también porque pueden desencadenar multitud de efectos secundarios, incluyendo la división celular incontrolada y la aparición espontánea de tumores (Volarevic et al., 2018). Debido a esto, cada vez más se estudia el papel del secretoma celular (exosomas, microvesículas (MVs) y otros factores que las células secretan al medio), como sustituto de las células madre en el campo de la medicina regenerativa (Yin, Loyer, & Boulanger, 2015). En línea con ello, estudiamos el papel de las MVs secretadas por las ASC en el proceso de migración celular. Para ello, realizamos un ensayo de migración celular de células endoteliales HMEC tratadas con

diferentes medios provenientes de las ASC, observando una mayor cicatrización y migración endotelial al tratar las células con medio rico en MVs derivadas de ASC, y siendo este proceso independiente de VEGF, coincidiendo por tanto con los datos obtenidos hasta ahora tanto en el tejido total como en las células ASC aisladas.

Por otro lado, al igual que el TA-S y el TA-V poseen diferentes localización, propiedades y funciones, también es necesario discernir entre los diferentes TA-V, ya que dependiendo de la proximidad a un determinado órgano, este puede producir un efecto sinérgico, afectando a su composición y funcionalidad (Hill, Solt, & Foster, 2018). Es por ello que, a la hora de estudiar el efecto del TA en la enfermedad cardiovascular, aunque la obesidad central también afecta a esta patología (Fuster, Ouchi, Gokce, & Walsh, 2016; Poirier et al., 2006), cada vez son más los trabajos que, mediante el uso de técnicas de imagen, ratifican la importancia del estudio del tejido adiposo que rodea el corazón, para así entender mejor la patología cardiovascular, ya que este cubre aproximadamente el 80% del tejido cardiaco (Gaborit, Sengenès, Ancel, Jacquier, & Dutour, 2017; Lee, Després, & Koh, 2013; Mandviwala et al., 2016). En condiciones normales, el tejido adiposo visceral que rodea al corazón puede ejercer un efecto protector, secretando adipocinas con efecto anti-inflamatorio y anti-aterogénico (Sacks & Fain, 2007), pero al igual que ocurre con otros tejidos adiposos, la presencia de FRCVs como puede ser la obesidad o la diabetes, produce una alteración en la composición del TA, dando lugar a una hipertrofia e hiperplasia de los adipocitos, promoviendo así un estado pro-inflamatorio y nocivo, tanto en el propio tejido como en las moléculas que este secreta al exterior (Burhans, Hagman, Kuzma, Schmidt, & Kratz, 2018). Por todo esto, en esta tesis decidimos, no sólo analizar la composición del tejido adiposo cardiaco según su localización, sino también ver como la presencia de diferentes comorbilidades afecta a la composición de

este. Aislamos células ASC a partir del tejido adiposo acumulado en dos localizaciones del corazón de pacientes que eran sometidos a cirugía de trasplante cardiaco. Para ello, extrajimos la grasa acumulada alrededor del ápex (tejido adiposo ventricular del miocardio, VMAT), así como la grasa acumulada alrededor de la arteria coronaria lateral anterior descendente (LAD, tejido adiposo peri-vascular, PVAT) e inmediatamente aislamos las células ASC. Una vez caracterizadas las células mediante el análisis de expresión de marcadores celulares por citometría de flujo, comparamos la velocidad de proliferación y la viabilidad de estas células, observando una mejor comportamiento de las células de ápex (mASC).

Como sabemos, la terapia celular ha sido ampliamente estudiada en el campo de la regeneración, incluyendo la regeneración cardiaca (Singh, Singh, & Sen, 2016), y es también sabido que el tejido adiposo es uno de los mayores reservorios de células madre mesenquimales del organismo (De Francesco, Ricci, D'Andrea, Nicoletti, & Ferraro, 2015), por todo ello, decidimos analizar el perfil angiogénico de estas células, analizando la expresión de diferentes genes relacionados con el proceso de angiogénesis. Pese a la mayor viabilidad observada en las mASC, fueron las células perivasculares (pASC) las que expresaron niveles significativamente mayores de VEGFA, así como la reducción del gen COL18a1, que codifica a la proteína anti-angiogénica Endoglina (Park, Sorenson, & Sheibani, 2015). Además, los niveles de proteína TF aparecieron también aumentados en las pASC. Estos resultados sugieren que, posiblemente debido a su mayor proximidad a la arteria coronaria, las pASC poseen un mayor potencial angiogénico que las mASC.

Como habíamos visto en el tejido adiposo subcutáneo y otros tejidos viscerales, la presencia de patologías como la obesidad y la diabetes, afectan significativamente la composición y propiedades del tejido adiposo y las células que este contiene, por lo que nuevamente

decidimos analizar el diferente comportamiento celular debido a la presencia de comorbilidades en el donante. Se sabe que, la presencia de 2 o más FRCV aumenta el riesgo de sufrir un ECV un 22,6% (Benjamin et al., 2018). En línea con esto, observamos que la presencia de un clúster de FRCV (cFRCV, 2 o más factores de riesgo), producía una reducción de los niveles de VEGFA, sobretodo en las pASC, acompañado de un aumento de los niveles de COL18a1, corroborando por tanto la hipótesis de que, un mayor número de FRCV, tiene también un efecto deletéreo sobre las ASC derivadas de tejido adiposo cardíaco. De igual forma, la presencia de obesidad, así como de una enfermedad isquémica, conllevan a un deterioro en las propiedades angiogénicas de estas células.

Pese a ser un tejido visceral, el tejido adiposo cardíaco posee características propias, y diferentes de otras localizaciones viscerales. En estudios previos habíamos visto como las ASC de origen subcutáneo, independientemente de la presencia de obesidad, no eran capaces de formar estructuras capilares al ser sembradas en una superficie tridimensional de matrigel (Oñate et al., 2012), sin embargo aquí observamos como las pASV y las mASC por igual, son capaces de formar estas estructuras tubulares, corroborando de nuevo la heterogeneidad del tejido adiposo en función de su localización.

Previamente, habíamos visto como las ASC subcutáneas y viscerales secretaban al medio diferentes microvesículas y exosomas, que poseían también capacidades regenerativas. Debido al dispar comportamiento observado en el tejido adiposo cardíaco comparado con el resto de tejidos adiposos, decidimos analizar también sus microvesículas, para comprobar si conservaban esta capacidad regenerativa. Aislamos las MVs derivadas de las mASC y observamos que, aunque las mASC provenientes de pacientes con obesidad y diabetes secretaban al medio un mayor número de MVs (totales y

annexina V positivas), estas expresaban un nivel significativamente reducido de miR-126, ampliamente estudiado, como ya habíamos visto, por su papel pro-angiogénico (Fish et al., 2008), comparado con las MVs provenientes de voluntarios sin obesidad ni diabetes, MVs ricas también en TF.

Además, analizando la velocidad de migración de las células endoteliales HMEC-1, observamos que, al igual que ocurría con las MVs provenientes del TA-S y el TA-V, cuando estas células eran tratadas con un medio rico en MVs derivadas de mASC, la velocidad de migración aumentaba significativamente, comparado con las células tratadas con medio al que se le habían eliminado todas las MVs. Además, al analizar el perfil génico de estas células endoteliales HMEC-1, tratadas 24 horas con medio proveniente de las eASC, observamos niveles aumentados de VEGFA comparado con las HMEC tratadas 24 horas con su medio. Este aumento de VEGFA ocurrió en todas las condiciones (Medio condicionado, medio sin MVs y medio rico en MVs), lo que sugiere que, no solo las MVs son responsables del potencial regenerativo de las ASC, sino que están implicados el conjunto de exosomas, MVs y demás partículas secretadas por las células al medio.

En resumen, los resultados obtenidos en esta tesis, ponen de manifiesto el importante papel que tienen que la obesidad y la diabetes, junto con el resto de factores de riesgo, en el desarrollo de la enfermedad cardiovascular, afectando significativamente a la composición y propiedades del tejido adiposo, y sugiriendo la necesidad de implantar intervenciones nutricionales que nos ayuden a reducir la incidencia de estas patologías. Asimismo, los resultados obtenidos inciden en la importancia de la localización del tejido adiposo a la hora de analizar tanto tejido adiposo total, como su contenido celular. Además, en esta tesis se describe por primera vez

la existencia de células madre en los diferentes depósitos de grasa rodeando el corazón, que a su vez poseen diferentes propiedades. Finalmente, teniendo en cuenta el retroceso que han sufrido los estudios de regeneración con células madre, y aunque es necesaria una investigación más profunda en el campo, esta tesis propone la implantación de terapias regenerativas a partir de exosomas y microvesículas, secretadas por las células madre derivadas del tejido adiposo, que poseen capacidad angiogénica *per sé*.

CONCLUSIONES

A partir de todos los resultados presentados a lo largo de esta tesis doctoral podemos establecer que:

- **Las intervenciones nutricionales producen mejoras significativas en la incidencia de factores de riesgo cardiovascular.**
 - Dietas ricas en fitoesteroles producen una mejora en el perfil inflamatorio.
 - Dietas ricas en omega-3 inducen una mejora en el metabolismo lipídico.
 - La sustitución de sacarosa con un edulcorante de origen natural como es el pinitol, produce cambios en la vía de secreción de la insulina, ayudando así a reducir los niveles de glucosa en pacientes con intolerancia a la glucosa.

- **La obesidad afecta negativamente al perfil angiogénico e inflamatorio de individuos sanos.**
 - La obesidad disminuye el potencial angiogénico mediado por VEGF del tejido adiposo subcutáneo.

- **La presencia de diabetes afecta en mayor medida a los depósitos de grasa visceral.**

- **El perfil angiogénico del tejido adiposo varía en función de su localización.**
 - El tejido adiposo subcutáneo posee mayor potencial angiogénico que el tejido adiposo visceral. Sin embargo la vía del VEGF está aumentada tanto en los depósitos de grasa visceral como en las ASC que este contiene.
 - Las ASC procedentes del tejido adiposo en contacto con la arteria coronaria (Tejido adiposo perivascular), poseen un

mayor potencial angiogénico que las ASC procedentes del tejido adiposo localizado en el ápex.

- **Las ASC secretan al medio microvesículas y exosomas con potencial regenerativo.**
 - Las microvesículas y exosomas secretados por las ASC, independientemente de la localización del tejido adiposo del que provengan, inducen una mayor capacidad de migración y regeneración de las células endoteliales HMEC-1.
 - El tratamiento de las células endoteliales con medio libre de microvesículas, produce una reducción del potencial regenerativo de las células endoteliales HMEC-1
 - La expresión de VEGFA de las células endoteliales HMEC-1 aumenta significativamente al ser tratada con sobrenadante de ASC.

BIBLIOGRAFÍA

- Akbar, U., Yang, M., Kurian, D., & Mohan, C. (2017). Omega-3 fatty acids in rheumatic diseases a critical review. *Journal of Clinical Rheumatology*, 23(6), 330–339. <http://doi.org/10.1097/RHU.0000000000000563>
- American Diabetes Association. (2011). Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*, 34, S062–S069.
- Amundson, D. E., Djurkovic, S., & Matwiyoff, G. N. (2010). The obesity paradox. *Critical Care Clinics*. <http://doi.org/10.1016/j.ccc.2010.06.004>
- Antonopoulos, A. S., & Tousoulis, D. (2017). The molecular mechanisms of obesity paradox. *Cardiovascular Research*, 113(9), 1074–1086. <http://doi.org/10.1093/cvr/cvx106>
- Arderiu, G., Peña, E., Aledo, R., Juan-Babot, O., & Badimon, L. (2011). Tissue factor regulates microvessel formation and stabilization by induction of chemokine (C-C motif) ligand 2 expression. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 31(11), 2607–2615. <http://doi.org/10.1161/ATVBAHA.111.233536>
- Arderiu, G., Peña, E., Aledo, R., Juan-Babot, O., Crespo, J., Vilahur, G., ... Badimon, L. (2019). MicroRNA -145 Regulates the Differentiation of Adipose Stem Cells Toward Microvascular Endothelial Cells and Promotes Angiogenesis. *Circulation Research*. <http://doi.org/10.1161/circresaha.118.314290>
- Arnold, M., Renehan, A. G., & Colditz, G. A. (2017). Excess weight as a risk factor common to many cancer sites: Words of caution when interpreting meta-analytic evidence. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*. <http://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-16-0940>
- Atkinson, M. A., & Eisenbarth, G. S. (2001). Type 1 diabetes: new perspectives on disease pathogenesis and treatment. *The Lancet*, 358(9277), 221–229.
- Bäck, M., Weber, C., & Lutgens, E. (2015). Regulation of atherosclerotic plaque inflammation. *Journal of Internal Medicine*, 278(5), 462–482. <http://doi.org/10.1111/joim.12367>
- Badimon, J. J., Badimon, L., & Fuster, V. (1990). Regression of atherosclerotic lesions by high density lipoprotein plasma fraction in the cholesterol-fed rabbit. *Journal of Clinical Investigation*, 85(4), 1234–1241. <http://doi.org/10.1172/JC1114558>
- Badimón, J. J., Santos-Gallego, C. G., & Badimón, L. (2010). Importancia del colesterol HDL en la aterotrombosis. ¿De dónde venimos? ¿Hacia dónde vamos? *Revista Espanola de*

- Cardiología*, 63(SUPPL. 2), 20–35. [http://doi.org/10.1016/S0300-8932\(10\)70150-0](http://doi.org/10.1016/S0300-8932(10)70150-0)
- Badimon, L., & Cubedo, J. (2017). Adipose tissue depots and inflammation: Effects on plasticity and resident mesenchymal stem cell function. *Cardiovascular Research*, 113(9), 1064–1073. <http://doi.org/10.1093/cvr/cvx096>
- Badimon, L., Oñate, B., & Vilahur, G. (2015). Células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo y su potencial reparador en la enfermedad isquémica coronaria. *Revista Española de Cardiología*, 68(7), 599–611. <http://doi.org/10.1016/j.recesp.2015.02.025>
- Badimon, L., & Vilahur, G. (2012). LDL-cholesterol versus HDL-cholesterol in the atherosclerotic plaque: Inflammatory resolution versus thrombotic chaos. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1254(1), 18–32. <http://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2012.06480.x>
- Badimon, L., & Vilahur, G. (2014). HDL particles – more complex than we thought. *Thrombosis and Haemostasis*, 112, 857.
- Badimon, L., Vilahur, G., & Cubedo, J. (2016). High density lipoproteins and kidney function: the friend turned foe? *Journal of Thoracic Disease*, 8(11), 2978–2981. <http://doi.org/10.21037/jtd.2016.11.66>
- Badimon, L., Vilahur, G., & Padro, T. (2010). Nutraceuticals and atherosclerosis: Human trials. *Cardiovascular Therapeutics*, 28(4), 202–215. <http://doi.org/10.1111/j.1755-5922.2010.00189.x>
- Bai, Y., & Sun, Q. (2015). Macrophage recruitment in obese adipose tissue. *Obesity Reviews*, 16(2), 127–136. <http://doi.org/10.1111/obr.12242>
- Banegas, J. R., Villar, F., Graciani, A., & Rodríguez-Artalejo, F. (2006). Epidemiología de las enfermedades cardiovasculares en España. *Revista Española de Cardiología Suplementos*, 6(7), 3G–12G. [http://doi.org/10.1016/S1131-3587\(06\)75324-9](http://doi.org/10.1016/S1131-3587(06)75324-9)
- Bang, H. O., Dyerberg, J., & Hjörne, N. (1976). The Composition of Food Consumed by Greenland Eskimos. *Acta Medica Scandinavica*, 200(1–6), 69–73. <http://doi.org/10.1111/j.0954-6820.1976.tb08198.x>
- Bañuls, C., Rovira-Llopis, S., Falcón, R., Veses, S., Monzó, N., Víctor, V. M., ... Hernández-Mijares, A. (2016). Chronic consumption of an inositol-enriched carob extract improves postprandial glycaemia and insulin sensitivity in healthy subjects: A

- randomized controlled trial. *Clinical Nutrition*, 35(3), 600–607. <http://doi.org/10.1016/j.clnu.2015.05.005>
- Barter, P. J., & Rye, K. a. (1996). High density lipoproteins and coronary heart disease. *Atherosclerosis*, 121(1), 1–12. [http://doi.org/10.1016/0021-9150\(95\)05675-0](http://doi.org/10.1016/0021-9150(95)05675-0)
- Bayes-Genis, A., Gálvez-Montón, C., Prat-Vidal, C., & Soler-Botija, C. (2013). Cardiac adipose tissue: A new frontier for cardiac regeneration? *International Journal of Cardiology*, 167(1), 22–25. <http://doi.org/10.1016/j.ijcard.2012.05.082>
- Benjamin, E. J., Virani, S. S., Callaway, C. W., Chang, A. R., Cheng, S., Chiuve, S. E., ... Muntner, P. (2018). Heart Disease and Stroke Statistics—2018 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation*, 137(12), E67–E492. <http://doi.org/10.1161/CIR.0000000000000558>
- Bertaso, A. G., Bertol, D., Duncan, B. B., & Foppa, M. (2013). Epicardial Fat: Definition, Measurements and Systematic Review of Main Outcomes. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, 18–28. <http://doi.org/10.5935/abc.20130138>
- Bertomeu, V., & Castillo-Castillo, J. (2008). Situación de la enfermedad cardiovascular en España. Del riesgo a la enfermedad. *Revista Española de Cardiología Suplementos*, 8(5), 2E–9E. [http://doi.org/10.1016/S1131-3587\(08\)76101-6](http://doi.org/10.1016/S1131-3587(08)76101-6)
- Besler, C., Heinrich, K., Rohrer, L., Doerries, C., Riwanto, M., Shih, D. M., ... Landmesser, U. (2011). Mechanisms underlying adverse effects of HDL on eNOS-activating pathways in patients with coronary artery disease. *The Journal of Clinical Investigation*, 121(7), 2693–708. <http://doi.org/10.1172/JCI42946>
- Bódis, K., & Roden, M. (2018). Energy metabolism of white adipose tissue and insulin resistance in humans. *European Journal of Clinical Investigation*, (e13017). <http://doi.org/10.1111/eci.13017>
- Bora, P., & Majumdar, A. S. (2017). Adipose tissue-derived stromal vascular fraction in regenerative medicine: A brief review on biology and translation. *Stem Cell Research and Therapy*. <http://doi.org/10.1186/s13287-017-0598-y>
- Buckland, G., & Gonzalez, C. A. (2015). The role of olive oil in disease prevention: A focus on the recent epidemiological evidence from cohort studies and dietary intervention trials. *British Journal of Nutrition*, 113(S2), S94–S101. <http://doi.org/10.1017/S0007114514003936>
- Burhans, M. S., Hagman, D. K., Kuzma, J. N., Schmidt, K. A., & Kratz,

- M. (2018). Contribution of Adipose Tissue Inflammation to the Development of Type 2 Diabetes Mellitus. *Comprehensive Physiology*, 9(1), 1–58. <http://doi.org/10.1002/cphy.c170040>
- Cabezas-Agrícola, J. M. (2017). Tendencias de la mortalidad por diabetes en Espan por el buen camino Trends in Mortality From Diabetes in Spain : On the Right Way. *Revista Esp Cardiol*, 70(6), 421–422.
- Calabuig, Á., Barba, J., Guembe, M. J., Díez, J., Berjón, J., Martínez-Vila, E., ... Toledo, E. (2017). Grasa epicárdica en la población general de mediana edad y su asociación con el síndrome metabólico. *Revista Española de Cardiología*, 70(4), 254–260. <http://doi.org/10.1016/j.recesp.2016.07.025>
- Calder, P. C. (2015). Functional Roles of Fatty Acids and Their Effects on Human Health. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*. <http://doi.org/10.1177/0148607115595980>
- Caporarello, N., Lupo, G., Olivieri, M., Cristaldi, M., Cambria, M. T., Salmeri, M., & Anfuso, C. D. (2017). Classical VEGF, Notch and Ang Signalling in cancer angiogenesis, alternative approaches and future directions (review). *Molecular Medicine Reports*. <http://doi.org/10.3892/mmr.2017.7179>
- Carlos, S., De La Fuente-Arrillaga, C., Bes-Rastrollo, M., Razquin, C., Rico-Campà, A., Martínez-González, M., & Ruiz-Canela, M. (2018). Mediterranean Diet and Health Outcomes in the SUN Cohort. *Nutrients*, 10(4), 439. <http://doi.org/10.3390/nu10040439>
- Carmeliet, P. (2003). Angiogenesis in health and disease. *Nature Medicine*, 9(6), 653–660. <http://doi.org/10.1038/nm0603-653>
- Carmeliet, P., & Jain, R. K. (2000). Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*. <http://doi.org/10.1038/35025220>
- Chang, E., Varghese, M., & Singer, K. (2018). Gender and Sex Differences in Adipose Tissue. *Current Diabetes Reports*. <http://doi.org/10.1007/s11892-018-1031-3>
- Chang, Y.-H., & Wu, M.-H. (2015). *Microbioreactors for Cartilage Tissue Engineering. Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* (Vol. 1340). http://doi.org/10.1007/978-1-4939-2938-2_17
- Chhabra, L., & Gurukripa Kowligi, N. (2015). Cardiac adipose tissue: Distinction between epicardial and pericardial fat remains important! *International Journal of Cardiology*, 201(2015), 274–275. <http://doi.org/10.1016/j.ijcard.2015.08.068>
- Choe, S. S., Huh, J. Y., Hwang, I. J., Kim, J. I., & Kim, J. B. (2016). Adipose tissue remodeling: Its role in energy metabolism and

- metabolic disorders. *Frontiers in Endocrinology*.
<http://doi.org/10.3389/fendo.2016.00030>
- Cnop, M., Welsh, N., Jonas, J. C., Jorns, A., Lenzen, S., & Eizirik, D. L. (2005). Mechanisms of pancreatic b-cell death in type 1 and type 2 diabetes: Many differences, few similarities. *Diabetes, 54 Suppl 2*, S97–S107. Retrieved from 05.12.21 Cnop
- Corvera, S., & Gealekman, O. (2014). Adipose tissue angiogenesis: Impact on obesity and type-2 diabetes. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*.
<http://doi.org/10.1016/j.bbadis.2013.06.003>
- Cubedo, J., Padro, T., & Badimon, L. (2014). Glycoproteome of human apolipoprotein A-I: N- and O-glycosylated forms are increased in patients with acute myocardial infarction. *Translational Research, 164*(3), 209–222.
- Daniels, T. F., Killinger, K. M., Michal, J. J., Wright, R. W., & Jiang, Z. (2009). Lipoproteins, cholesterol homeostasis and cardiac health. *International Journal of Biological Sciences, 5*(5), 474–488.
<http://doi.org/10.7150/ijbs.5.474>
- Davis, A., Christiansen, M., Horowitz, J. F., Klein, S., Hellerstein, M. K., & Ostlund, R. E. (2000). Effect of pinitol treatment on insulin action in subjects with insulin resistance. *Diabetes Care, 23*(7), 1000–1005. <http://doi.org/10.2337/diacare.23.7.1000>
- Dawber, T. R., Kannel, W. B., & Lyell, L. P. (1963). An approach to longitudinal studies in a community: The Framingham study. *Annals of the New York Academy of Sciences, 107*(2), 539–556.
<http://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1963.tb13299.x>
- De Francesco, F., Ricci, G., D'Andrea, F., Nicoletti, G. F., & Ferraro, G. A. (2015). Human Adipose Stem Cells: From Bench to Bedside. *Tissue Engineering. Part B, Reviews, 21*(6), 572–84.
<http://doi.org/10.1089/ten.TEB.2014.0608>
- Demir, R., Seval, Y., & Huppertz, B. (2007). Vasculogenesis and angiogenesis in the early human placenta. *Acta Histochemica*.
<http://doi.org/10.1016/j.acthis.2007.02.008>
- Derosa, G., Limas, C. P., Maciás, P. C., Estrella, A., & Maffioli, P. (2014). Dietary and nutraceutical approach to type 2 diabetes. *Archives of Medical Science*.
<http://doi.org/10.5114/aoms.2014.42587>
- Domínguez, B. M. P. J. A. G. (2016). Atherosclerosis: origen y desarrollo de una patología cardiovascular prevalente. *Encuentros En La Biología, IX*(161).

- Du Clos, T. W. (2013). Pentraxins: structure, function, and role in inflammation. *ISRN Inflammation*, 2013, 379040. <http://doi.org/10.1155/2013/379040>
- Eckel, R. H., Alberti, K. G. M. M., Grundy, S. M., & Zimmet, P. Z. (2010). Hypertriglyceridemia, insulin resistance, and the metabolic syndrome. *Lancet*, 375(9710), 181–3. [http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)61794-3](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)61794-3)
- Errico, T. L., Chen, X., Martin Campos, J. M., Julve, J., Escolà-Gil, J. C., & Blanco-Vaca, F. (2013). Mecanismos básicos: Estructura, función y metabolismo de las lipoproteínas plasm. *Clinica E Investigacion En Arteriosclerosis*, 25(2), 98–103. <http://doi.org/10.1016/j.arteri.2013.05.003>
- Esteve Ràfols, M. (2014). Tejido adiposo: Heterogeneidad celular y diversidad funcional. *Endocrinologia Y Nutricion*. <http://doi.org/10.1016/j.endonu.2013.03.011>
- F. Piepoli, M. (2017). 2016 European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice. *International Journal of Behavioral Medicine*, 24(3), 321–419. <http://doi.org/10.1007/s12529-016-9583-6>
- Fan, L., Wu, Q., Xing, X., Wei, Y., & Shao, Z. (2012). MicroRNA-145 targets vascular endothelial growth factor and inhibits invasion and metastasis of osteosarcoma cells. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 44(5), 407–414. <http://doi.org/10.1093/abbs/gms019>
- Feingold, K. R., & Grunfeld, C. (2015). *Introduction to Lipids and fatty acids*. *NCBI Bookshelf*. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- Fish, J. E., Santoro, M. M., Morton, S. U., Yu, S., Yeh, R.-F., Wythe, J. D., ... Srivastava, D. (2008). miR -126 regulates angiogenic signaling and vascular integrity. *Developmental Cell*, 15(2), 272–84. <http://doi.org/10.1016/j.devcel.2008.07.008>
- Fitzgibbons, T. P., & Czech, M. P. (2014). Epicardial and perivascular adipose tissues and their influence on cardiovascular disease: Basic mechanisms and clinical associations. *Journal of the American Heart Association*, 3(2), 1–15. <http://doi.org/10.1161/JAHA.113.000582>
- Fundación Española del Corazón. (2011). *La FEC alerta de la aparición de nuevos factores de riesgo cardiovascular*.
- Fuster, J. J., Ouchi, N., Gokce, N., & Walsh, K. (2016). Obesity-induced changes in adipose tissue microenvironment and their

- impact on cardiovascular disease. *Circulation Research*.
<http://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.115.306885>
- Gaborit, B., Sengenès, C., Ancel, P., Jacquier, A., & Dutour, A. (2017). Role of epicardial adipose tissue in health and disease: A matter of fat? *Comprehensive Physiology*, 7(3), 1051–1082.
<http://doi.org/10.1002/cphy.c160034>
- Goldstein, J. L., & Brown, M. S. (2016). Genes to Statins, 161(1), 161–172. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2015.01.036.A>
- Golia, E., Limongelli, G., Natale, F., Fimiani, F., Maddaloni, V., Pariggiano, I., ... Calabrò, P. (2014). Inflammation and cardiovascular disease: From pathogenesis to therapeutic target. *Current Atherosclerosis Reports*, 16(9).
<http://doi.org/10.1007/s11883-014-0435-z>
- Grundy, S. M., Cleeman, J. I., Daniels, S. R., Donato, K. A., Eckel, R. H., Franklin, B. A., ... Costa, F. (2005). Diagnosis and management of the metabolic syndrome: An American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute scientific statement. *Circulation*, 112(17), 2735–2752.
<http://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.105.169404>
- Guglielmi, V., & Sbraccia, P. (2017). Epicardial adipose tissue: at the heart of the obesity complications. *Acta Diabetologica*, 54(9), 805–812. <http://doi.org/10.1007/s00592-017-1020-z>
- Gupta, S. (2015). LDL Cholesterol, Statins and PCSK 9 Inhibitors. *Indian Heart Journal*, 67(5), 419–424.
<http://doi.org/10.1016/j.ihj.2015.05.020>
- Gylling, H., & Simonen, P. (2015). Phytosterols, phytostanols, and lipoprotein metabolism. *Nutrients*, 7(9), 7965–7977.
<http://doi.org/10.3390/nu7095374>
- Havel, R. J., Eder, H. A., & Bragdon, J. H. (1955). The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *The Journal of Clinical Investigation*, 34(9), 1345–1353. <http://doi.org/10.1172/JCI103182>
- Hill, J. H., Solt, C., & Foster, M. T. (2018). Obesity associated disease risk: the role of inherent differences and location of adipose depots. *Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation*, 33(2). <http://doi.org/10.1515/hmbci-2018-0012>
- Hodge, A. M., English, D. R., O’Dea, K., & Giles, G. G. (2004). Glycemic index and dietary fiber and the risk of type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 27(11), 2701–2706.
<http://doi.org/10.2337/diacare.27.11.2701>

- Hossain, P., Kawar, B., & El Nahas, M. (2007). Obesity and diabetes in the developing world: a growing challenge. *New England Journal of Medicine*, 356(3), 213–215.
- Hotamisligil, G. S., Arner, P., Caro, J. F., Atkinson, R. L., & Spiegelman, B. M. (1995). Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor- α in human obesity and insulin resistance. *The Journal of Clinical Investigation*, 95(5), 2409–15. <http://doi.org/10.1172/JCI117936>
- Huang, H., Bhat, A., Woodnutt, G., & Lappe, R. (2010). Targeting the ANGPT-TIE2 pathway in malignancy. *Nature Reviews Cancer*, 10(8), 575–585. <http://doi.org/10.1038/nrc2894>
- Hubert, H. B., Feinleib, M., McNamara, P. M., & Castelli, W. P. (1983). Obesity as an independent risk factor for cardiovascular disease: a 26- year follow-up of participants in the Framingham Heart Study. *Circulation*, 67(5), 968–77. <http://doi.org/10.1161/01.CIR.67.5.968>
- Iacobellis, G. (2009). Epicardial and Pericardial Fat: Close, but Very Different. *Obesity*, 17(4), 625. <http://doi.org/10.1038/oby.2008.622>
- Ibanez, B., Vilahur, G., & Badimon, J. J. (2007). Plaque progression and regression in atherothrombosis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 5(SUPPL. 1), 292–299. <http://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2007.02483.x>
- Ibrahim, M. M. (2010). Subcutaneous and visceral adipose tissue: Structural and functional differences. *Obesity Reviews*, 11(1), 11–18. <http://doi.org/10.1111/j.1467-789X.2009.00623.x>
- INE (Instituto Nacional de Estadística). (2017). Retrieved August 29, 2017, from <http://www.ine.es/dynt3/inebase/es/index.htm?padre=3652&capsel=3653>
- Innis, S. M. (2014). Omega-3 Fatty Acid Biochemistry: Perspectives from Human Nutrition. *Military Medicine*, 179(11S), 82–87. <http://doi.org/10.7205/MILMED-D-14-00147>
- International Diabetes Federation (IDF). (2017). *IDF Diabetes Atlas 8th edition*.
- Jaacks, L. M., Siegel, K. R., Gujral, U. P., & Narayan, K. M. V. (2016). Type 2 diabetes: A 21st century epidemic. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 30(3), 331–343.
- Jain, a, Aggarwal, K., & Zhang, P. (2015). Omega-3 fatty acids and cardiovascular disease. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 19, 441–445.

- <http://doi.org/10.1097/MCO.0b013e3280127af0>
- Jensen, M. D. (2008). Role of body fat distribution and the metabolic complications of obesity. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. <http://doi.org/10.1210/jc.2008-1585>
- Jing, K., Wu, T., Lim, K. (2013). Omega-3 polyunsaturated fatty acids and cancer. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 13(8), 1162–77. <http://doi.org/10.2174/18715206113139990319>
- Johnson, R. K., Appel, L. J., Brands, M., Howard, B. V., Lefevre, M., Lustig, R. H., ... Wylie-Rosett, J. (2009). Dietary sugars intake and cardiovascular health a scientific statement from the american heart association. *Circulation*, 120(11), 1011–1020. <http://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.109.192627>
- Jones, P., MacDougall, D. E., Ntanios, F., & Vanstone, C. A. (2011). Dietary phytosterols as cholesterol-lowering agents in humans. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 75(3), 217–227. <http://doi.org/10.1139/y97-011>
- Kannel, W. B., Dawber, T. R., Friedman, G. D., Glennon, W. E., & Mcnamara, P. M. (1964). Risk Factors in Coronary Heart Disease. An Evaluation of Several Serum Lipids as Predictors of Coronary Heart Disease The Framingham Study. *Annals of Internal Medicine*, 61(5_Part_1), 888–899. <http://doi.org/10.7326/0003-4819-61-5-888>
- Kannel, W. B., & McGee, D. L. (1979). Diabetes and Cardiovascular Disease: The Framingham Study. *JAMA: The Journal of the American Medical Association*, 241(19), 2035–2038. <http://doi.org/10.1001/jama.1979.03290450033020>
- Karlsson, H., Leanderson, P., Tagesson, C., & Lindahl, M. (2005). Lipoproteomics I: Mapping of proteins in low-density lipoprotein using two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Proteomics*, 5(2), 551–565. <http://doi.org/10.1002/pmic.200300938>
- Kershaw, E. E., & Flier, J. S. (2004). Adipose tissue as an endocrine organ. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 89(6), 2548–2556. <http://doi.org/10.1210/jc.2004-0395>
- Keys, A. (1961). The Risk of Coronary Heart Disease. *Circulation*, XXIII(6), 805–812. <http://doi.org/10.1161/01.CIR.24.6.1283>
- Keys, A. (1994). *Lessons for Science from the Seven Countries Study A 35-Year Collaborative Experience in Cardiovascular Disease Epidemiology*. Tokyo: Springer Verlag.
- Keys, A., Menotti, A., Karvonen, M. J., Aravanjs, C., Blackburn, H.,

- Buzina, R., ... Toshima, H. (1986). The diet and 15-year death rate in the seven countries study. *American Journal of Epidemiology*, 124(6), 903–915. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1093/aje/kwx101>
- Kingery, S. E., Wu, Y. L., Zhou, B., Hoffman, R. P., & Yu, C. Y. (2012). Gene Copy-Number Variations (CNVs) and Protein Levels of Complement C4A and C4B as Novel Biomarkers for Partial Disease Remissions in New-Onset Type 1 Diabetes Patients. *Pediatr Diabetes*, 13(5), 408–418. <http://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.12.017>.Two-stage
- Klein, S., Burke, L. E., Bray, G. A., Blair, S., Allison, D. B., Pi-Sunyer, X., ... Eckel, R. H. (2004). Clinical implications of obesity with specific focus on cardiovascular disease: A statement for professionals from the American Heart Association Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism. *Circulation*. <http://doi.org/10.1161/01.CIR.0000145546.97738.1E>
- Kurth, T., Gaziano, J. M., Berger, K., Kase, C. S., Rexrode, K. M., Cook, N. R., ... Manson, J. E. (2002). Body mass index and the risk of stroke in men. *Archives of Internal Medicine*, 162, 2557–2562. <http://doi.org/10.1001/archinte.162.22.2557>
- Lafontan, M. (2014). Adipose tissue and adipocyte dysregulation. *Diabetes and Metabolism*, 40(1), 16–28. <http://doi.org/10.1016/j.diabet.2013.08.002>
- Lahoz, C., & Mostaza, J. M. (2007). La aterosclerosis como enfermedad sistémica. *Revista Española de Cardiología*, 60(2), 184–195. <http://doi.org/10.1157/13099465>
- Landmesser, U. (2012). High Density Lipoprotein – Should we Raise it? *Current Vascular Pharmacology*, 10(6), 718–719. <http://doi.org/10.2174/157016112803520710>
- Lee, H. Y., Després, J. P., & Koh, K. K. (2013). Perivascular adipose tissue in the pathogenesis of cardiovascular disease. *Atherosclerosis*, 230(2), 177–184. <http://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2013.07.037>
- Lemoine, A. Y., Ledoux, S., & Larger, E. (2013). Adipose tissue angiogenesis in obesity. *Thrombosis and Haemostasis*, 110(4), 661–669. <http://doi.org/10.1160/TH13-01-0073>
- Lidell, M. E., Betz, M. J., & Enerbäck, S. (2014). Brown adipose tissue and its therapeutic potential. *Journal of Internal Medicine*. <http://doi.org/10.1111/joim.12255>
- Linares, P. M., Chaparro, M., & Gisbert, J. P. (2014). Angiopietins in

- inflammation and their implication in the development of inflammatory bowel disease. A review. *Journal of Crohn's and Colitis*, 8(3), 183–190. <http://doi.org/10.1016/j.crohns.2013.06.013>
- Litwin, S. E. (2008). Which Measures of Obesity Best Predict Cardiovascular Risk? *Journal of the American College of Cardiology*, 52(8), 616–619. <http://doi.org/10.1016/j.jacc.2008.05.017>
- Liu, Z., Fan, F., Wang, A., Zheng, S., & Lu, Y. (2014). Dll4-Notch signaling in regulation of tumor angiogenesis. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*. <http://doi.org/10.1007/s00432-013-1534-x>
- Lundgren, C. H., Brown, S. L., Nordt, T. K., Sobel, B. E., & Fujii, S. (1996). Elaboration of Type-1 Plasminogen Activator Inhibitor From Adipocytes. *Circulation*, 93(1), 106–110. Retrieved from <http://circ.ahajournals.org/content/93/1/106.abstract>
- Macdonald, I. A. (2016). A review of recent evidence relating to sugars, insulin resistance and diabetes. *European Journal of Nutrition*. <http://doi.org/10.1007/s00394-016-1340-8>
- Mackay, J., & Mensah, G. A. (2004). *The Atlas of Heart Disease and Stroke*. *Journal of Human Hypertension* (Vol. 19). <http://doi.org/10.1038/sj.jhh.1001852>
- Mandviwala, T., Khalid, U., & Deswal, A. (2016). Obesity and Cardiovascular Disease: a Risk Factor or a Risk Marker? *Current Atherosclerosis Reports*, 18(5). <http://doi.org/10.1007/s11883-016-0575-4>
- Marcadenti, A., & de Abreu-Silva, E. O. (2015). Different adipose tissue depots: Metabolic implications and effects of surgical removal. *Endocrinología Y Nutrición*, 62(9), 458–464. <http://doi.org/10.1016/j.endonu.2015.05.010>
- Martínez Triguero, M. L., Veses Martín, S., Garzón Pastor, S., & Mijares, a. H. (2012). Alteraciones del metabolismo de las lipoproteínas. *Medicine (Spain)*, 11(19), 1125–1129. [http://doi.org/10.1016/S0304-5412\(12\)70438-9](http://doi.org/10.1016/S0304-5412(12)70438-9)
- Massimo, D., Piepoli, F., Hoes, A. W., Bajos, P., Noruega, S. A., Alemania, C. A., ... Países, V. (2017). Guía ESC 2016 sobre prevención de la enfermedad cardiovascular en la práctica clínica. *Rev Esp Cardiol*, 69(10), 939.e1–e87. <http://doi.org/10.1016>
- Matsumoto, K., & Ema, M. (2014). Roles of VEGF-A signalling in development, regeneration, and tumours. *Journal of Biochemistry*.

<http://doi.org/10.1093/jb/mvu031>

- McClelland, R. L., Jorgensen, N. W., Budoff, M., Blaha, M. J., Post, W. S., Kronmal, R. a., ... Burke, G. L. (2015). 10-Year Coronary Heart Disease Risk Prediction Using Coronary Artery Calcium and Traditional Risk Factors Derivation in the MESA (Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis) with Validation in the HNR (Heinz Nixdorf Recall) Study and the DHS (Dallas Heart Stud. *Journal of the American College of Cardiology*, 66(15), 1643–1653. <http://doi.org/10.1016/j.jacc.2015.08.035>
- McLaughlin, T., Lamendola, C., Liu, A., & Abbasi, F. (2011). Preferential fat deposition in subcutaneous versus visceral depots is associated with insulin sensitivity. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 96(11), E1756–E1760. <http://doi.org/10.1210/jc.2011-0615>
- Miller, M. (2009). Dyslipidemia and cardiovascular risk: The importance of early prevention. *QJM*, 102(9), 657–667. <http://doi.org/10.1093/qjmed/hcp065>
- Mohammadi, M., Ramezankhani, A., Mohammadi, S., Zahed, S., Khabiri, F., Khodakarim, S., ... Ghayur, M. (2017). The predictors of metabolic syndrome based on Walker Health-Promoting lifestyle in Iran 2016. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*. <http://doi.org/10.1016/j.dsx.2017.05.009>
- Must, A., Spadano, J., Coakley, E. H., Field, A. E., Colditz, G., & Dietz, W. H. (1999). The Disease Burden Associated With Overweight and Obesity. *JAMA*, 282(16), 1523. <http://doi.org/10.1001/jama.282.16.1523>
- Nathan, D. M. (2015). Diabetes: Advances in Diagnosis and Treatment. *JAMA*, 314(10), 1052–1062.
- National Research Council (US) Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. (n.d.). *Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*.
- Netter, F. H. (2006). *Atlas of human anatomy. Exp Neurol* (Vol. 97).
- Nordestgaard, B. G., & Varbo, A. (2014). Triglycerides and cardiovascular disease. *The Lancet*, 384(9943), 626–635. [http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)61177-6](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)61177-6)
- O'Neill, S., & O'Driscoll, L. (2015). Metabolic syndrome: A closer look at the growing epidemic and its associated pathologies. *Obesity Reviews*, 16(1), 1–12. <http://doi.org/10.1111/obr.12229>
- Oikonomou, E. K., & Antoniadou, C. (2019). The role of adipose tissue

- in cardiovascular health and disease. *Nature Reviews Cardiology*. <http://doi.org/10.1038/s41569-018-0097-6>
- Oñate, B., Vilahur, G., Ferrer-Lorente, R., Ybarra, J., Díez-Caballero, A., Ballesta-López, C., ... Badimon, L. (2012). The subcutaneous adipose tissue reservoir of functionally active stem cells is reduced in obese patients. *FASEB Journal*, *26*(10), 4327–4336. <http://doi.org/10.1096/fj.12-207217>
- Orio, F., Muscogiuri, G., Nese, C., Palomba, S., Savastano, S., Tafuri, D., ... Yildiz, B. O. (2016). Obesity , type 2 diabetes mellitus and cardiovascular disease risk: an uptodate in the management of polycystic ovary syndrome. *European Journal of Obstetrics and Gynecology*, 6–11. <http://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2016.08.026>
- Padro, T., Vilahur, G., Sanchez-Hernandez, J., Hernandez, M., Antonijuan, R. M., Perez, A., & Badimon, L. (2015). Lipidomic changes of LDL in overweight and moderately hypercholesterolemic subjects taking phytosterol- and omega-3-supplemented milk. *J Lipid Res*, *56*(5), 1043–1056. <http://doi.org/10.1194/jlr.P052217>
- Panee, J. (2012). Monocyte Chemoattractant Protein 1 (MCP-1) in obesity and diabetes. *Cytokine*, *60*(1), 1–12. <http://doi.org/10.1016/j.cyto.2012.06.018>
- Park, S., Sorenson, C. M., & Sheibani, N. (2015). PECAM-1 isoforms, eNOS and endoglin axis in regulation of angiogenesis. *Clinical Science*, *129*(3), 217–234. <http://doi.org/10.1042/CS20140714>
- Pekkanen, J., Nissinen, A., Puska, P., Punsar, S., & Karvonen, M. J. (1989). Risk factors and 25 year risk of coronary heart disease in a male population with a high incidence of the disease: the Finnish cohorts of the seven countries study. *BMJ (Clinical Research Ed.)*, *299*(6691), 81–85.
- Pizzini, A., Lunger, L., Demetz, E., Hilbe, R., Weiss, G., Ebenbichler, C., & Tancevski, I. (2017). The role of omega-3 fatty acids in reverse cholesterol transport: A review. *Nutrients*. <http://doi.org/10.3390/nu9101099>
- Poirier, P., Giles, T. D., Bray, G. A., Hong, Y., Stern, J. S., Pi-Sunyer, F. X., & Eckel, R. H. (2006). Obesity and Cardiovascular Disease: Pathophysiology, Evaluation, and Effect of Weight Loss. *Circulation*, *113*(6), 898 LP-918. <http://doi.org/10.1161/circulationaha.106.171016>
- Poskitt, E. M. E. (2014). Childhood obesity in low- and middle-income countries. *Paediatrics and International Child Health*, *34*(4), 239–249. <http://doi.org/10.1179/2046905514Y.0000000147>

- Puska, P., Laatikainen, T., Korpelainen, V., & Vartiainen, E. (2016). Contribution of the North Karelia Project to International Work in CVD and NCD Prevention and Health Promotion. *Global Heart*, *11*(2), 243–246. <http://doi.org/10.1016/j.ghheart.2016.04.009>
- Racette, S. B. S. B., Lin, X., Lefevre, M., Spearie, C. A., Most, M. M., Ma, L., & Jr, R. E. O. (2010). Dose effects of dietary phytosterols on cholesterol metabolism: a controlled feeding study. ... *American Journal of ...*, *91*(1), 32–38. <http://doi.org/10.3945/ajcn.2009.28070>.INTRODUCTION
- Rader, D. J., & Hovingh, G. K. (2014). HDL and cardiovascular disease. *The Lancet*, *384*(9943), 618–625. [http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)61217-4](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)61217-4)
- Ray, I., Bhattacharya, A., & De, R. K. (2017). OCDD: An obesity and co-morbid disease database. *BioData Mining*, *10*(1). <http://doi.org/10.1186/s13040-017-0153-5>
- Rehrer, C. W., Karimpour-Fard, A., Hernandez, T. L., Law, C. K., Stob, N. R., Hunter, L. E., & Eckel, R. H. (2012). Regional differences in subcutaneous adipose tissue gene expression. *Obesity*, *20*(11), 2168–2173. <http://doi.org/10.1038/oby.2012.117>
- Reisin, E., & Alpert, M. a. (2005). Definition of the metabolic syndrome: current proposals and controversies. *The American Journal of the Medical Sciences*, *330*(6), 269–72. <http://doi.org/10.1097/00000441-200512000-00003>
- Ridker, P. M. (2014). LDL cholesterol: Controversies and future therapeutic directions. *The Lancet*, *384*(9943), 607–617. [http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)61009-6](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)61009-6)
- Rivard, A., & Isner, J. M. (1998). Angiogenesis and vasculogenesis in treatment of cardiovascular disease. *Molecular Medicine*, *4*(10), 429–440.
- Rocca, B., Fox, K. A. A., Ajan, R. A., Andreotti, F., Baigent, C., Collet, J. P., ... Storey, R. F. (2018). Antithrombotic therapy and body mass: An expert position paper of the ESC Working Group on Thrombosis. *European Heart Journal*. <http://doi.org/10.1093/eurheartj/ehy066>
- Rocha, V. Z., Ras, R. T., Gagliardi, A. C., Mangili, L. C., Trautwein, E. A., & Santos, R. D. (2016). Effects of phytosterols on markers of inflammation: A systematic review and meta-analysis. *Atherosclerosis*, *248*, 76–83. <http://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2016.01.035>
- Sabatine, M. S., Giugliano, R. P., Keech, A. C., Honarpour, N., Wiviott,

- S. D., Murphy, S. a, ... FOURIER Steering Committee and Investigators. (2017). Evolocumab and Clinical Outcomes in Patients with Cardiovascular Disease. *The New England Journal of Medicine*, 376(18), 1713–1722. <http://doi.org/10.1056/NEJMoa1615664>
- Sacks, H. S., & Fain, J. N. (2007). Human epicardial adipose tissue: A review. *American Heart Journal*, 153(6), 907–917. <http://doi.org/10.1016/j.ahj.2007.03.019>
- Samad, F., & Ruf, W. (2016). Review Article Inflammation , obesity , and thrombosis. *Blood J*, 122(20), 3415–3423. <http://doi.org/10.1182/blood-2013-05-427708.coagulation>
- Sangrós, F. J., Torrecilla, J., Giráldez-García, C., Carrillo, L., Mancera, J., Mur, T., ... Regidor, E. (2018). Asociación de obesidad general y abdominal con hipertensión, dislipemia y presencia de prediabetes en el estudio PREDAPS. *Revista Espanola de Cardiología*, 71(3), 170–177. <http://doi.org/10.1016/j.recesp.2017.04.010>
- Santos-Gallego, C. G., & Badimon, J. J. (2012). Las concentraciones bajas de colesterol unido a las lipoproteínas de alta densidad se asocian de manera independiente a enfermedad coronaria aguda en pacientes que ingresan por dolor torácico. *Revista Espanola de Cardiología*, 65(4), 319–325. <http://doi.org/10.1016/j.recesp.2011.07.022>
- Schetz, M., De Jong, A., Deane, A. M., Druml, W., Hemelaar, P., Pelosi, P., ... Jaber, S. (2019). Obesity in the critically ill: a narrative review. *Intensive Care Medicine*. <http://doi.org/10.1007/s00134-019-05594-1>
- Schulz, T. J., & Tseng, Y.-H. (2013). Brown adipose tissue: development, metabolism and beyond. *The Biochemical Journal*, 453(2), 167–78. <http://doi.org/10.1042/BJ20130457>
- Selthofer-Relatić, K., & Bošnjak, I. (2015). Myocardial fat as a part of cardiac visceral adipose tissue: Physiological and pathophysiological view. *Journal of Endocrinological Investigation*, 38(9), 933–939. <http://doi.org/10.1007/s40618-015-0258-y>
- Simons, M., & Ware, J. A. (2003). Therapeutic angiogenesis in cardiovascular disease. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2(11), 863–872. <http://doi.org/10.1038/nrd1226>
- Singh, A., Singh, A., & Sen, D. (2016). Mesenchymal stem cells in cardiac regeneration: A detailed progress report of the last 6 years (2010-2015). *Stem Cell Research and Therapy*. <http://doi.org/10.1186/s13287-016-0341-0>

- Snook, J. T., Park, S., Williams, G., Tsai Y-H, & Lee, N. (1999). Effect of synthetic triglycerides of myristic, palmitic, and stearic acid on serum lipoprotein metabolism. *European Journal of Clinical Nutrition*, *53*(8), 597–605. <http://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1600815>
- Steppan, C. M., Bailey, S. T., Bhat, S., Brown, E. J., Banerjee, R. R., Wright, C. M., ... Lazar, M. A. (2001). The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature*, *409*(6818), 307–312. <http://doi.org/10.1038/35053000>
- Strem, B. M., Hicok, K. C., Zhu, M., Wulur, I., Alfonso, Z., Schreiber, R. E., ... Hedrick, M. H. (2005). Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells. *Keio J. Med.*, *54*(0022–9717 (Print)), 132–141. <http://doi.org/10.2302/kjm.54.132>
- Tejada, S., Martorell, M., Capó, X., A. Tur, J., Pons, A., & Sureda, A. (2016). Omega-3 Fatty Acids in the Management of Epilepsy. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, *16*(17), 1897–1905. <http://doi.org/10.2174/1568026616666160204123107>
- Testa, U., Pannitteri, G., & Condorelli, G. L. (2008). Vascular endothelial growth factors in cardiovascular medicine. *Journal of Cardiovascular Medicine*. <http://doi.org/10.2459/JCM.0b013e3283117d37>
- Thankamony, A., Capalbo, D., Marcovecchio, M. L., Sleight, A., Jørgensen, S. W., Hill, N. R., ... Dunger, D. B. (2014). Low circulating levels of IGF-1 in healthy adults are associated with reduced β -cell function, increased intramyocellular lipid, and enhanced fat utilization during fasting. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, *99*(6), 2198–2207. <http://doi.org/10.1210/jc.2013-4542>
- Tobin, V., Gall, M. Le, Fioramonti, X., Stolarczyk, E., Blazquez, A. G., Klein, C., ... Brot-Laroche, E. (2008). Insulin internalizes GLUT2 in the enterocytes of healthy but not insulin-resistant mice. *Diabetes*, *57*(3), 555–562. <http://doi.org/10.2337/db07-0928>
- Tofovic, S. P., & Jackson, E. K. (2003). Rat models of the metabolic syndrome. *Methods in Molecular Medicine*, *86*(1), 29–46. <http://doi.org/10.1385/1-59259-392-5:29>
- Trajkovska, K. T., & Topuzovska, S. (2017). High-density lipoprotein metabolism and reverse cholesterol transport: strategies for raising HDL cholesterol. *The Anatolian Journal of Cardiology*, *12*(2), 149–154. <http://doi.org/10.14744/anatoljcardiol.2017.7608>
- Varbo, A., & Nordestgaard, B. G. (2016). Remnant Cholesterol and Triglyceride-Rich Lipoproteins in Atherosclerosis Progression and Cardiovascular Disease. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and*

- Vascular Biology*, 36(11), 2133–2135.
<http://doi.org/10.1161/ATVBAHA.116.308305>
- Vilahur, G., & Badimon, L. (2015). Biological actions of pentraxins. *Vascular Pharmacology*, 73, 38–44.
<http://doi.org/10.1016/j.vph.2015.05.001>
- Vivanco, F., López-Bescós, L., Tuñón, J., & Egido, J. (2003). Proteómica y enfermedad cardiovascular. *Revista Española de Cardiología*, 56(3), 289–302. [http://doi.org/10.1016/S0300-8932\(03\)76865-1](http://doi.org/10.1016/S0300-8932(03)76865-1)
- Volarevic, V., Markovic, B. S., Gazdic, M., Volarevic, A., Jovicic, N., Arsenijevic, N., ... Stojkovic, M. (2018). Ethical and safety issues of stem cell-based therapy. *International Journal of Medical Sciences*. <http://doi.org/10.7150/ijms.21666>
- Wajchenberg, B. L. (2000). Subcutaneous and visceral adipose tissue: Their relation to the metabolic syndrome. *Endocrine Reviews*. <http://doi.org/10.1210/er.21.6.697>
- Weingärtner, O., Böhm, M., & Laufs, U. (2009). Controversial role of plant sterol esters in the management of hypercholesterolaemia. *European Heart Journal*, 30(4), 404–409.
<http://doi.org/10.1093/eurheartj/ehn580>
- WHO. (2016). *Cardiovascular diseases (CVDs)*.
- WHO. (2017). *Obesity and overweight*. Retrieved from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>
- Wietecha, M. S., & DiPietro, L. A. (2013). Therapeutic Approaches to the Regulation of Wound Angiogenesis. *Advances in Wound Care*, 2(3), 81–86. <http://doi.org/10.1089/wound.2011.0348>
- Wilson, P. W. F., D'Agostino, R. B., Levy, D., Belanger, A. M., Silbershatz, H., & Kannel, W. B. (1998). Prediction of Coronary Heart Disease Using Risk Factor Categories. *Circulation*, 97(18), 1837–1847. <http://doi.org/10.1161/01.CIR.97.18.1837>
- Woudberg, N. J., Pedretti, S., Lecour, S., Schulz, R., Vuilleumier, N., James, R. W., & Frias, M. a. (2018). Pharmacological intervention to modulate HDL: What do we target? *Frontiers in Pharmacology*, 8(JAN), 1–16. <http://doi.org/10.3389/fphar.2017.00989>
- Wronska, a., & Kmiec, Z. (2012). Structural and biochemical characteristics of various white adipose tissue depots. *Acta Physiologica*, 205(2), 194–208. <http://doi.org/10.1111/j.1748-1716.2012.02409.x>
- Yin, M., Loyer, X., & Boulanger, C. M. (2015). Extracellular vesicles as

new pharmacological targets to treat atherosclerosis. *European Journal of Pharmacology*.
<http://doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.06.047>

Yusuf, P. S., Hawken, S., Ôunpuu, S., Dans, T., Avezum, A., Lanas, F., ... Lisheng, L. (2004). Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): Case-control study. *Lancet*, 364(9438), 937–952. [http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)17018-9](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)17018-9)

Zhao, L., Johnson, T., & Liu, D. (2017). Therapeutic angiogenesis of adipose-derived stem cells for ischemic diseases. *Stem Cell Research and Therapy*. <http://doi.org/10.1186/s13287-017-0578-2>

Zucker, L. M. (1965). Hereditary Obesity in the Rat Associated With Hyperlipemia. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 131(1), 447–458. <http://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1965.tb34810.x>

