



Caracterización transcriptómica y funcional de las células madre mesenquimales residentes en tejido adiposo de pacientes obesos

Blanca Oñate Hospital



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència [Reconeixement 3.0. Espanya de Creative Commons](#).

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia [Reconocimiento 3.0. España de Creative Commons](#).

This doctoral thesis is licensed under the [Creative Commons Attribution 3.0. Spain License](#).

UNIVERSIDAD DE BARCELONA

Programa de Doctorado en Biomedicina

Facultad de Medicina

Caracterización transcriptómica y funcional de las células madre mesenquimales residentes en tejido adiposo de pacientes obesos

Centro de Investigación Cardiovascular (CSIC-ICCC)

Institut Català de Ciències Cardiovasculars

Memoria presentada por:

Blanca Oñate Hospital

Para optar al grado de Doctora en Biomedicina por la Universidad de Barcelona

Barcelona, 2013

Blanca Oñate Hospital

Doctoranda

Dra. Lina Badimon Maestro

Directora

A mi familia.

Tras varios años, esta tesis no podría haberse acabado sin la ayuda, el consejo, y el soporte de tanta gente.....muchas gracias a todos!

Primero de todo me gustaría agradecerle a Lina el haberme dejado trabajar con ella y con su grupo. Gracias por haber confiado en mí, en que sacaríamos esta tesis adelante, por todos los consejos, por enseñarme a valorar cada resultado aunque pareciera que no valía la pena, y por haberme enseñado a contestar siempre a la pregunta “¿Y el siguiente artículo?”.

Gemma, esta tesis sin ti no hubiera sido lo mismo. Muchas gracias por apoyarme siempre, por ayudarme en todo momento, por escuchar siempre mis teorías, por muy locas que fueran, y por intentar entenderlas aunque fueran muy abstractas.....esto de los arrays nos ha costado lo suyo!!! Gracias por haber sido siempre tan optimista, aunque en algunos momentos ver el final era difícil. Todo llega....y esta tesis es el ejemplo!

Mónica y Raquel, gracias por haber sido mis compañeras y amigas todo este tiempo. Desde el principio me acogisteis tanto en el 005, para comer y desayunar.....y aquí estamos celebrando el final de mi tesis! Gracias por haber estado siempre a mi lado, tanto en el ICCO como fuera. Me habéis enseñado muchísimas cosas, tanto de trabajo como personales, y habéis sido un gran apoyo todo este tiempo. De corazón, gracias!

Gracias al laboratorio 005 por acogerme desde un principio. Cuando llegué éramos cuatro gatos, pero últimamente creo que es uno de los laboratorios con más gente! Maite, gracias por tu alegría, por compartir tus ideas y escuchar las mías, por echarme una mano siempre y por formar parte del equipo ASC! Raquel de la Torre, gracias por hacernos reír siempre, tanto cuando estábamos en el 005 o ahora en la biblio, no hay anécdota que tú no hayas vivido!! Martona, gràcies per tot!! Per la reflexologia, per formar un equip amb mi a la Teknon, ningú com tu i jo sap lo que ha costat tirar endavant aquestes cèl·lules!!! Gràcies per interessar-te sempre per mi i donar-me ànims. Pablo, Javier, Josep y Juanjo, gracias por vuestros consejos y ayuda. Y los que ya no están y siempre formarán parte del 005, Blanca Molins, gracias por tus consejos, y aunque te hayas ido, aún hay gente que pregunta “¿Cuál de las dos Blancas?”. Cri, gracias por tu humor y tus historias, si yo he llegado al final, tú también!!

En estos últimos años, gracias a los que han sido mis compañeros de mesa en la biblioteca. Hemos pasado muchos finales de tesis juntos.....y todos sabemos que son unos meses bastante intensos.....así que gracias por aguantarme!!!! Gracias a Rodri, Jose, Roberta, Olivier y Anna Guadall. Ahora la próxima soy yo! Gracias por servirme de ejemplo, entre todos vamos superando los trámites horribles que nos hacen pasar para depositar la tesis. Sergi, perdona por todas las charlas que te pegamos sobre la tesis....y gracias por tener siempre merienda para compartir! Roberta, me ha

encantado que hayamos ido a la par en estos últimos meses de escritura y depósito de tesis. Tener a alguien que está pasando exactamente lo mismo es un consuelo!!! Por fin lo hemos conseguido!!!! Jose, gracias por aportarnos un poco de friquismo por estos lados....la verdad es que echamos de menos tu puesta al día de conciertos y series! Rodri, aún me acuerdo de cuando llegué y me asignaron la mesa del ordenador y delante se sentaba un mexicano con perilla....empezaste siendo mi instructor en cultivos, y hasta me has tenido que enseñar como depositar todos estos papeles de la tesis! Gracias por siempre dar tu punto de vista de ingeniero para solucionar cualquier problema, y animarme a continuar a pesar de que los dos sabemos lo que cuesta acabar.... por fin hemos llegado al final! Gracias por todo.

María A, aunque no haga mucho que estés por aquí, gracias por tus consejos, por tu motivación, tú ánimo y tu alegría. Sandra y Javi, como siempre os digo es un placer trabajar con vosotros. Sandra, sin ti la mitad de esta tesis no se hubiera hecho, gracias por introducirme en el mundo de los arrays y la genómica!!!!

Gracias a las del laboratorio 004 Ilaria, Loli, Rosa y Judit. Judit gracias por estar siempre dispuesta a solucionar mis dudas con las ELISAs. Rosa, encara me'n recordo quan vam estar juntes al màster, i que durant la meva primera setmana aquí m'ho enseyaves tot. La pròxima tesis tú! Teresa, gracias por tu interés y tu ayuda siempre que la necesitaba. M^a José y Silvia, gracias por vuestra ayuda en todo y por dejarme colar "casi siempre" en el despacho de Lina.

Ester P, Gemma A, María B, Rosa A y Laura C, gracias por vuestros consejos, vuestra experiencia, y estar siempre dispuestas a ayudarme con mis dudas. Nia, Ester G, Diana, Sonia V, Patri y Laura, gracias por facilitarme siempre el trabajo en cultivos. Gracias a Sonia H, Olaya, Mari por ayudarme siempre que he tenido que hacer algo en el 001 o en el estabulario.

También quiero agradecer a otra gente del ICCC que me han acompañado todos estos años. A Oriol y M^a Angels por ayudarme con todos mis bloques de parafina de tejido adiposo. A Maisa y Ana Navarrete por hacerme compañía y ponerme música siempre que iba a cuantificar el RNA. A los del estabulario Angel, Sergi y Fani. A gerencia y administración: Joaquím, Jaume, Ángel, Pepy, Nuria, Meritxell, Montse, María, Raúl y Patri. A Mónica A, Sonia E, Carolina, Marta Guindo, Rafael, Ona, Montse, Quim Norma, Ana Luque, Judit S, Carlota, Mónica B, Maribel, Ana C, Mónica T, Roger, Carmen y Filo. Gracias al Dr. Bayés, Ana, Chema y Diego. Al laboratorio 110, Maruizio, Javi F, Silvia, Beatriz, Judit, Saray, María, Pepe y Cristina. Mar y Íngrid, gracias por animar siempre cultivos y estar dispuestas a ir de fiesta o a tomar birras!!!! Y a los del laboratorio 111, Paula, Laura, Roy, Elena, David, Alberto, Valentina y Vicenta.

Por supuesto, esta tesis no se hubiera podido hacer sin la ayuda y colaboración del Dr. Ybarra, Dr. Díez-Caballero, Dr. Ballesta y su equipo, Dr. Moscatiello y Dr. Herrero. Gracias por aceptarme siempre en sus quirófanos. Y a todos los pacientes que participaron en este estudio, gracias.

A les meves nenes maques les “biogirls”: Marta, Nuri, Bea, Montse, Fani, Ali i Maria, gràcies per ser sempre tan bones amigues. Des de primer de carrera fins ara hem passat moltes coses juntes....i les que queden!!!! Ja sabeu que us dic sempre..... ;) Erika, a ti te considero una más....desde Cambridge, Barcelona, y próxima parada Israel! No te vas a librar tan fácilmente de mi! I en especial a les santpauenques Rebeca i Bàrbara, gràcies per compartir el meu dia a dia, per trobar-vos pel menjador, per les nostres tardes berenant, anant al gym o al jacuzzi, o de compres....Sense vosaltres aquí, no hagués sigut lo mateix! Rebeca, que te voy a decir que no sepas.....hemos pasado de todo por nuestra etapa en St Pau.....empezando por el máster, los artículos, mi boda y la tuya, tu final de tesis....y ahora llega el mío!!!! Siempre has sido mi apoyo y mi ejemplo, gracias por ser tú, por estar SIEMPRE ahí: por ser mi mejor amiga.

Y por último, no podría haber acabado esta tesis sin el apoyo incondicional de mi familia. Gracias por apoyarme, por motivarme, por escucharme, y por creer siempre en mí. A mis padres, por enseñarme a disfrutar con la ciencia.

Agus, pocas personas han vivido esta tesis más de cerca que tú, y pocas personas han sido tan importantes para ayudarme a acabarla. A ti, en especial, te doy las gracias por TODO.

¡Gracias a todos!

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS.....	V
ÍNDICE DE TABLAS	IX
ABREVIACIONES	XIII
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1. LA OBESIDAD	3
1.1. GRADOS DE OBESIDAD.....	5
1.2. OBESIDAD: FACTOR DE RIESGO CARDIOVASCULAR.....	7
1.2.1. LA PARADOJA DE LA OBESIDAD	10
1.3. CIRUGÍAS PARA LA OBESIDAD.....	12
2. EL TEJIDO ADIPOSO	14
2.1. TEJIDO ADIPOSO BLANCO.....	15
2.1.1. ESTIRPES CELULARES DEL TEJIDO ADIPOSO.....	15
2.1.2. TIPOS DE TEJIDOS ADIPOSOS BLANCOS.....	19
2.1.3. FACTORES LIBERADOS POR EL TEJIDO ADIPOSO BLANCO.....	22
2.1.4. REMODELADO DEL TEJIDO ADIPOSO BLANCO	24
2.2. TEJIDO ADIPOSO MARRÓN.....	26
3. CÉLULAS MADRE DERIVADAS DEL TEJIDO ADIPOSO.....	28
3.1. CARACTERÍSTICAS DE LAS ASC	28
3.2. ORIGEN DE LAS ASC.....	31
3.3. ASC EN LOS DIFERENTES TEJIDOS ADIPOSOS BLANCOS.....	32
3.4. AFECTACIÓN DE LAS ASC POR SITUACIONES PATOFISIOLÓGICAS	33
3.5. ASC EN LA TERAPIA CELULAR	35
3.5.1. APLICACIONES TERAPÉUTICAS.....	36
II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	41
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	45
1. GRUPOS DE INDIVIDUOS.....	47
2. OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS.....	47
3. ANÁLISIS DE LOS PARÁMETROS BIOQUÍMICOS.....	48
4. OBTENCIÓN DE LAS ASC.....	48

5. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA	50
6. ESTUDIO DEL CRECIMIENTO CELULAR	51
7. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE <i>THROMBOSPONDIN-1</i>	52
8. ENSAYO DE FORMACIÓN DE TUBOS EN MATRIGEL.....	53
9. DIFERENCIACIÓN CELULAR.....	54
9.1. DIFERENCIACIÓN ADIPOGÉNICA.....	54
9.2. DIFERENCIACIÓN A CÉLULA ENDOTELIAL.....	55
10. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA.....	56
10.1. OBTENCIÓN DEL mRNA.....	56
10.2. GENECHIP® DE AFFYMETRIX	56
10.3. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO	57
10.4. PCR A TIEMPO REAL	58
10.4.1. TARJETAS MICROFLUÍDICAS.....	59
10.4.2. ASSAYS INDIVIDUALES	60
11. EXPRESIÓN PROTEICA	61
11.1. PROTEÍNA TOTAL	61
11.2. SUBFRACCIONAMIENTO CELULAR	61
11.3. WESTERN-BLOT.....	62
IV. RESULTADOS.....	65
ARTÍCULO 1	67
ARTÍCULO 2	79
V. DISCUSIÓN GENERAL.....	95
VI. CONCLUSIONES.....	107
VII. BIBLIOGRAFÍA.....	111

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Prevalencia mundial de la obesidad.....	4
Figura 2. Prevalencia de alteraciones del peso en el registro MESYAS	5
Figura 3. Riesgo de desarrollar otras enfermedades o factores de riesgo cardiovascular asociados a la obesidad	7
Figura 4. Evolución y patología del síndrome metabólico.	9
Figura 5. Relación entre las categorías de peso según el índice de masa corporal y el riesgo de muerte de cualquier causa.....	11
Figura 6. Ejemplos de cirugías bariátricas.....	13
Figura 7. Distribución de los depósitos de tejido adiposo en humanos	14
Figura 8. Cortes histológicos representativos de tejido adiposo blanco subcutáneo abdominal de individuos delgados y obesos.....	15
Figura 9. Esquema que ilustra los procesos de lipogénesis y lipólisis que se llevan a cabo en los adipocitos maduros.....	16
Figura 10. Tipos de macrófagos	18
Figura 11. Evolución de la diferenciación adipogénica	19
Figura 12. Desarrollo de la resistencia a la insulina en individuos obesos	22
Figura 13. Relación entre los adipocitos blancos, marrones y los miocitos.....	27
Figura 14. Potencial de diferenciación de las ASC	30
Figura 15. Reservorios de MSC	32
Figura 16. Esquema del método de aislamiento de las ASC a partir de un trozo de tejido adiposo	49
Figura 17. Cinética de crecimiento celular	52
Figura 18. Esquema resumen del proceso de extracción del RNA a partir de células en cultivo	56
Figura 19. Análisis del transcriptoma usando Microarrays de DNA.....	57
Figura 20. TaqMan® Array Micro Fluidic Cards	60
Figura 21. Red de señalización hipotética que proponemos para explicar la regulación diferencial de la expresión génica que hemos encontrado entre las ASC de pacientes obesos y de individuos no-obesos	104

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Comorbilidades asociadas a la obesidad.....	7
Tabla 2. Factores de riesgo cardiovascular	8
Tabla 3. Definiciones del Síndrome Metabólico	10
Tabla 4. Comparación funcional entre el tejido adiposo subcutáneo y el visceral.....	20
Tabla 5. Factores secretados por el tejido adiposo blanco.....	23
Tabla 6. Marcadores de superficie característicos de las ASC	29
Tabla 7. Ensayos clínicos realizados con ASC.....	36
Tabla 8. Listado de los <i>assays</i> utilizados	59

ABREVIACIONES

ACTA2	<i>Actin, alpha 2, smooth muscle, aorta</i>
ADAS	<i>Adipose-derived adult stem cells</i>
AdMSC	<i>adipose mesenchymal stem cells</i>
ADSC	<i>adipose-derived stromal cells</i>
Ang-1	<i>Angiopoietin-1</i>
ANOVA	Análisis de la varianza, del inglés <i>Analysis of variance</i>
AQP7	<i>Aquaporin-7</i>
ASC	Células madre derivadas del tejido adiposo, del inglés <i>Adipose-derived stromal/stem cells</i>
ASCmo	ASC derivadas de pacientes obesos mórbidos
ASCn	ASC derivadas de pacientes no-obesos
ASXL2	<i>Additional sex combs like 2</i>
ATP	<i>Adenosine triphosphate</i>
ATP-III	<i>Adult Treatment Panel III</i>
B	Biotina del inglés <i>Biotin</i>
BDNF	<i>Brain-derived neurotrophic factor</i>
bFGF	<i>basic Fibroblast growth factor</i>
BMI	Índice de masa corporal, del inglés <i>Body mass index</i>
BM-MSC	Células madre mesenquimales de la médula ósea, del inglés <i>Bone-marrow mesenchymal stem cells</i>
BMP	<i>Bone morphogenetic protein</i>
C/EBP	<i>CCAAT/enhancer-binding protein</i>
cDNA/RNA	<i>complementary Deoxyribonucleic acid/Ribonuclei acid</i>
CM	Quilomicrones, del inglés <i>Chylomicron</i>
CREB	<i>cAMP response element-binding</i>
CTLA4	<i>Cytotoxic T-Lymphocyte antigen 4</i> fusionado con anticuerpos
DAPK1	<i>Death-associated protein kinase 1</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>

dscDNA	<i>double-stranded cDNA</i>
ECM	Matriz extracelular, del inglés <i>Extracellular matrix</i>
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
EGIR	<i>European Group for the Study of Insulin Resistance</i>
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas, del inglés <i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>
EPAC	<i>Exchange proteins directly activated by cAMP</i>
EPC	Células progenitoras endoteliales, del inglés <i>Endothelial progenitor cells</i>
EZH2	<i>Enhancer of zeste homologue 2</i>
FABP	<i>Fatty-acid-binding proteins</i>
FAT/CD36	<i>Fatty acid translocase</i>
FATP	<i>Fatty-acid transport protein</i>
FBS	<i>Fetal bovine serum</i>
FDR	<i>False Discovery Rate</i>
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i>
GAFP	<i>Glial acidic fibrillar protein</i>
GATA	<i>GATA-binding protein</i>
GEFT	<i>Guanine nucleotide exchange factor T</i>
Glut4	<i>Glucose transporter type 4</i>
Glycerol-3P	<i>Glycerol 3-phosphate</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte/macrophage growth factor</i>
GR	<i>Glucocorticoid receptor</i>
HAPLN1	<i>Hyaluronan and proteoglycan link protein 1</i>
HDAC9	<i>Histone deacetylase 9</i>
HDL	Lipoproteínas de alta densidad, del inglés <i>High density lipoprotein</i>
HGF	<i>Hepatocyte growth factor</i>
HLA-II	<i>Human leukocyte antigen</i>
HOXC10	<i>Homeobox C10</i>

HSL	<i>Hormone-sensitive lipase</i>
HUVEC	Células Endoteliales de la Vena del Cordón Umbilical, del inglés <i>Human umbilical vein endothelial cells</i>
IDF	<i>International Diabetes Federation</i>
IFN γ	<i>Interferon γ</i>
IGF-1	<i>Insuline-like growth factor 1</i>
IL	<i>Interleukins</i>
IOTF	<i>International Obesity Task Force</i>
IPA	Ingenuity® <i>Pathway Analysis</i>
Ipf-1	<i>Insulin promoter factor 1</i>
IR	Resistencia a la insulina, del inglés <i>Insulin resistance</i>
Isl-1	<i>Insulin gene enhancer protein</i>
JAK2	<i>Janus kinase 2</i>
JMJD2C	<i>Jumonji domain-containing 2C</i>
KGF	<i>Keratinocyte growth factor</i>
KLF4	<i>Krüppel-like factor 4</i>
KROX20	<i>Early growth response 2 (EGR2)</i>
LDL	Lipoproteínas de baja densidad, del inglés <i>Low density lipoproteins</i>
LIF	<i>Leukemia inhibitory factor</i>
LPL	<i>Lipoprotein lipase</i>
LPS	Lipopolisacárido, del inglés <i>Lipopolysaccharide</i>
MAD	Célula parcialmente diferenciada a adipocito, del inglés <i>Mesenchymal adipocyte-like default cells</i>
MAP-2	<i>Microtubule-associated protein 2</i>
MCP-1	<i>Monocyte chemotactic protein-1</i> , también conocida como quimoquina 2 (CCL2)
MetS	Síndrome metabólico, del inglés <i>Metabolic síndrome</i>
MIF	<i>Macrophage migration inhibitory factor</i>
MLL3	<i>Myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukaemia 3</i>

MMP	<i>Matrix metalloproteinases</i>
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero, del inglés <i>Messenger Ribonucleic acid</i>
MSC	Células madre mesenquimales, del inglés <i>Mesenchymal stem cells</i>
MYF5	<i>Myogenic factor 5</i>
Myod1	<i>Myogenic differentiation 1</i>
NeuN	<i>Neuronal Nuclei</i>
Ngn-3	<i>Neurogenin 3</i>
Nkx2.5	<i>NK2 homeobox 5</i>
OCN	<i>Osteocalcin</i>
OGTT	Prueba de tolerancia a la glucosa administrada por vía oral, del inglés <i>Oral glucose tolerance test</i>
OLR1	<i>Oxidized low density lipoprotein receptor 1</i>
OMS	Organización Mundial de la Salud
OPN	<i>Osteopontin</i>
p190 RHOGAP	<i>p190B RHO GTPase-activating protein</i>
PAI-1	<i>Plasminogen activator inhibitor-1</i>
PAX	<i>Paired box protein</i>
PBS1X	<i>Phosphate buffered saline</i>
PC5	<i>Phycoerythrin Cyanin 5</i>
PCA	Análisis de componentes principales, del inglés <i>Principal component analysis</i>
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa, del inglés <i>Polymerase chain reaction</i>
PDGF	<i>Platelet-derived growth factor</i>
PDT	Tasa de duplicación celular, del inglés <i>Population doubling time</i>
PE	<i>Phycoerythrin</i>
PECAM-1	<i>Platelet endothelial cell adhesion molecule 1</i>
PGC1 α	<i>PPARγ coactivator 1-α</i>
PITX2	<i>Paired-like homeodomain 2</i>
PKA	<i>Protein kinase A</i>

PLA	<i>Processed lipoaspirate cells</i>
PPAR γ	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor γ</i>
PRDM16 PR	<i>Domain containing 16</i>
PTIP	<i>PAX transactivation domain-interacting protein</i>
RAC	<i>Rho family of GTPases</i>
REV-ERB α	<i>Nuclear receptor subfamily 1 group D member 1 (NR1D1)</i>
RIN	<i>RNA integrity number</i>
RNS	Especies reactivas de nitrógeno, del inglés <i>reactive nitrogen species</i>
ROCK2	<i>RHO-associated kinase 2</i>
ROS	Especies reactivas de oxígeno, del inglés <i>reactive oxygen species</i>
RUNX2	<i>Runt-related transcription factor 2</i>
SDF-1	<i>Stromal derive factor-1</i> , también conocida como quimiocina C-X-C 12 (CXCL12)
SETD8	<i>SET domain-containing 8</i>
SETDB1	<i>SET domain bifurcated 1</i>
SHN2	<i>Schnurri 2 SIRT sirtuin</i>
Smad	<i>SMAD family member</i>
STAT	<i>Signal transducer and activator of transcription</i>
SVF	Fracción vascular del estroma, del inglés <i>Stromal vascular fraction</i>
TAZ	<i>Transcriptional co-activator with PDZ-binding motif</i>
TBX15	<i>T-box 15</i>
TCF21	<i>Transcription factor 21</i>
TCF7L1	<i>T cell-specific transcription factor 7-like 1</i>
TG	Triglicéridos, del inglés <i>Triglyceride</i>
TGF β	<i>Transforming growth factor-β</i>
Tie-2	<i>TEK tyrosine kinase endothelial o Angiopoietin receptor</i>
TIMP3	<i>Tissue inhibitor of MMPs 3</i>
TLE3	<i>Transducin-like enhancer 3</i>

TLR4	<i>Toll like receptor 4</i>
TNFRSF11B	<i>Tumor necrosis factor receptor superfamily member 11b o Osteoprotegerin</i>
TNF- α	<i>Tumor necrosis factor-α</i>
TSP-1	<i>Thrombospondin-1</i>
UCP-1	<i>Uncoupling protein-1</i>
VEGF	<i>Vascular endotelial growth factor</i>
VEGFR2	<i>Vascular endothelial growth factor receptor 2</i>
VLDL	Lipoproteínas de muy baja densidad, del inglés <i>Very low-density lipoprotein</i>
vWF	<i>Von Willebrand factor</i>
WC	Perímetro de la cintura del inglés <i>Waist circumference</i>
WHR	Índice cintura-cadera, del inglés <i>Waist to hip ratio</i>
WNT	<i>Wingless-type MMTV integration site family</i>
YAP	<i>Yes-associated protein</i>
ZFP423	<i>Zinc-finger protein 423</i>

I. INTRODUCCIÓN

1. LA OBESIDAD

La obesidad es una enfermedad crónica y compleja, de origen multifactorial, que se produce al ingerir más nutrientes de los que el individuo necesita, y se desarrolla por la interacción del genotipo y el medio ambiente. Se caracteriza por una acumulación excesiva de grasa o hipertrofia general 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 donde está asociada con numerosas complicaciones y comorbilidades, y con un incremento de la mortalidad. Las causas del desarrollo de la obesidad son varias y muchas de ellas aún no están claras, pero se conoce que tiene su raíz en factores sociales, culturales, de comportamiento, fisiológicos, metabólicos y genéticos, los cuales condicionan su tratamiento de forma decisiva. De hecho, se trata de un trastorno que comienza en la infancia, florece en la edad adulta y da origen a múltiples problemas de salud (Barness *et al.*, 2007).

La obesidad es considerada la epidemia del siglo XXI y afecta a un gran número de países, no solo desarrollados sino también en vías de desarrollo. Durante los últimos cincuenta años, la humanidad ha experimentado cambios drásticos en su entorno, su comportamiento y su estilo de vida. Estos cambios han derivado en un alarmante incremento global de la incidencia de obesidad (Hossain *et al.*, 2007). Uno de los últimos estudios de prevalencia de sobrepeso llevado a cabo por la Organización Mundial de la Salud (OMS) junto con la *International Obesity Task Force* (IOTF) encontró una prevalencia mundial, ajustada por diferencias étnicas, de 1.700 millones de personas con sobrepeso de las que 312 millones eran obesos (Figura 1) (Haslam and James, 2005; Hossain *et al.*, 2007). Del mismo modo, se ha observado en los últimos años un importante aumento de la prevalencia de obesidad infantil (Rocchini, 2002). La tendencia en las cifras de obesidad ha propiciado que, junto con el hambre, la desnutrición y las enfermedades infecciosas, se la considere una de las mayores amenazas del mundo desarrollado. De hecho, el sobrepeso y la obesidad son el quinto factor principal de riesgo de defunción en el mundo. Según la OMS, cada año mueren, como mínimo, 2,8 millones de personas a causa de la obesidad o sobrepeso.

Existen tres características importantes a destacar en cuanto a la prevalencia global de la obesidad:

- La prevalencia de sobrepeso y obesidad en regiones donde tradicionalmente dominaba la malnutrición ha aumentado drásticamente, por lo que se ha llegado a una situación donde casi la mitad de la población mundial presenta sobrepeso u obesidad.

- La prevalencia máxima de sobrepeso y obesidad en una población adulta se encuentra entre los 45 y 59 años, justo cuando la población adulta presenta más riesgo de padecer las comorbilidades asociadas a la obesidad.
- La prevalencia de obesidad en mujeres es superior que en hombres en la mayoría de los países o regiones afectadas. Esto es importante ya que las mujeres son más propensas de desarrollar diabetes que los hombres.

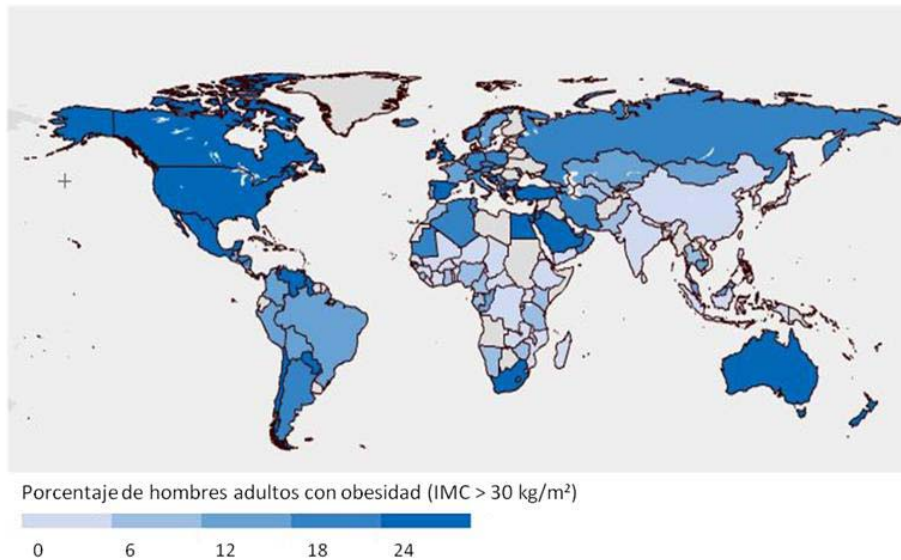


Figura 1. Prevalencia mundial de la obesidad (www.iotf.org).

En Europa la obesidad está presente en el 20% de la población adulta en edad media y en los Estados Unidos esta prevalencia es mucho mayor. En España hay numerosos estudios sobre prevalencia de obesidad en la población general (Aranceta *et al.*, 2003; Salas-Salvado *et al.*, 2007; Catalina Romero *et al.*, 2012; Gutierrez-Fisac *et al.*, 2012). En la Figura 2 se presentan, a modo de ejemplo, los del registro MESYAS sobre 18.778 trabajadores sanos (el 78% varones) (Alegria *et al.*, 2005).

La obesidad, hoy en día, es considerada una patología no sólo de gran prevalencia, sino también de gran impacto social. En las últimas décadas el interés por investigar en esta patología ha sido creciente y se ha centrado no sólo en su epidemiología, sino también en la fisiopatología, sus complicaciones o el tratamiento de la misma, entre otros aspectos. El surgimiento de la obesidad como una problemática de salud, y particularmente como un objeto de análisis desde una perspectiva de salud pública, ha cobrado un gran interés en los últimos años llevando a la OMS a establecer que esta afección constituye un grave problema de salud pública mundial (World Health Organization, 2000).

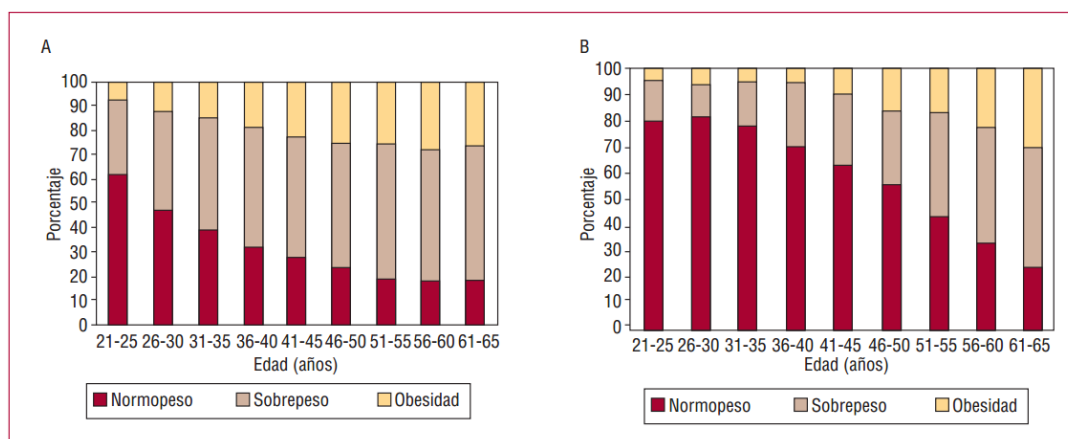


Figura 2. Prevalencia de alteraciones del peso en el registro MESYAS. Datos de 18.778 individuos sanos y españoles: (A) varones y (B) mujeres. Figura de Alegría y col. (Alegría Ezquerria *et al.*, 2008).

1.1. GRADOS DE OBESIDAD

Existen dos tipos de obesidad según el origen de ésta: la obesidad exógena, debida a una alimentación excesiva; y la obesidad endógena, originada por alteraciones metabólicas. Igualmente, dentro de las causas endógenas podemos distinguir entre las que están provocadas por disfunciones de alguna glándula endocrina, como la tiroides (obesidad hipotiroidea), o por deficiencia de las hormonas sexuales (obesidad gonadal).

De forma práctica, la obesidad puede ser diagnosticada típicamente en términos de salud midiendo el índice de masa corporal (BMI, del inglés *Body mass index*) que determina el contenido de la grasa corporal total, pero también en términos de su distribución de la grasa a través de la circunferencia de la cintura o la medida del índice cintura-cadera (WHR, del inglés *Waist to hip ratio*) que determinan los niveles de grasa intra-abdominal (National Institutes of Health, 1998).

El BMI o índice de Quételet es un indicador simple de la relación entre el peso y la altura (kg/m^2) que se utiliza frecuentemente para identificar el grado de obesidad de un individuo adulto. Se ha de tener en cuenta que el valor obtenido por el BMI no es constante, varía con la edad y el género, y depende de otros factores como la raza, la etnia y las proporciones de tejidos muscular y adiposo. Según la OMS, se definen diferentes grados de obesidad a partir de los valores de BMI:

- BMI menor de $18,5 \text{ kg}/\text{m}^2$: por debajo del peso normal.
- BMI de $18,5$ - $24,9 \text{ kg}/\text{m}^2$: peso normal.
- BMI de 25 - $29,9 \text{ kg}/\text{m}^2$: sobrepeso.
- BMI de 30 - $34,9 \text{ kg}/\text{m}^2$: obesidad de tipo I.
- BMI de 35 - $39,9 \text{ kg}/\text{m}^2$: obesidad de tipo II.

- BMI de 40-49,9 kg/ m²: obesidad de tipo III, o mórbida.
- BMI mayor de 50 kg/ m²: obesidad de tipo IV, o extrema.

Dentro del concepto de obesidad, se han descrito algunos subtipos que complementan la relación aparente dosis-respuesta que existe entre el BMI y sus consecuencias para la salud. Los más clásicos son los que corresponden a la obesidad androide (abdominal) y la ginoide (parte inferior del cuerpo) (Allison and Heshka, 1991; Walton *et al.*, 1995).

Otros subtipos, aunque menos conocidos, también son de gran interés. Así, se ha observado la existencia de un fenotipo correspondiente a individuos con peso normal pero metabólicamente obesos (*metabolically obese normal-weight*), es decir, tienen un BMI normal pero presentan las alteraciones típicas de los pacientes obesos: resistencia a la insulina, adiposidad central, bajos niveles de colesterol transportado por las lipoproteínas de alta densidad (HDL, del inglés *High density lipoprotein*), elevadas concentraciones de triglicéridos, así como hipertensión arterial (Ruderman *et al.*, 1981). Al mismo tiempo, existen los que se han denominado obesos metabólicamente sanos (*metabolically healthy obese*) (Karelis *et al.*, 2005). Estos individuos tienen un BMI > 30 kg/m², pero ninguna de las alteraciones metabólicas típicas de los individuos obesos. Estos dos subtipos «paradójicos» llevaron a que en las últimas dos décadas se realizaran varios estudios de caracterización metabólica y cuantificación del tejido adiposo visceral en contraposición al subcutáneo. Dichos estudios han puesto de manifiesto que aunque es cierto que la obesidad incrementa el riesgo de desarrollar enfermedades crónicas, parece claro que son los pacientes con obesidad visceral los que forman el subgrupo de individuos que presentan las alteraciones más graves del metabolismo.

Desde que en 2001 se publicó la primera descripción de la relación entre el aumento del BMI y la insuficiencia cardíaca (Horwich *et al.*, 2001), el BMI se ha utilizado en numerosos estudios como definición de la obesidad y ha adquirido la reputación de ser un buen indicador pronóstico de la evolución clínica de los pacientes con insuficiencia cardíaca. Sin embargo, a la hora de hablar de riesgo metabólico y cardiovascular, se ha visto que la obesidad abdominal tiene una vinculación más importante con el desarrollo de la enfermedad cardiovascular (Rexrode *et al.*, 1998). Teniendo en cuenta que el BMI es una medida que no distingue entre las diferentes formas de adiposidad, no podemos usarlo como un único predictor clínico y epidemiológico de la salud cardiovascular. Es por ello que otra medida complementaria para determinar mejor la relación del peso con el riesgo cardiovascular es el WHR, que relaciona el perímetro de la cintura con el de la cadera. De hecho el WHR ha sido el índice más ampliamente usado para clasificar anatómicamente la obesidad en androide y ginoide. La OMS establece unos niveles normales de WHR de 0,85 en mujeres y 0,9 en hombres, valores superiores indicarían una obesidad abdominovisceral, la cual está asociada con un

mayor riesgo cardiovascular. Por lo tanto, hoy en día la clasificación de la obesidad y la probabilidad de desarrollar otras enfermedades está basada tanto en el BMI como en el WHR (Figura 3).

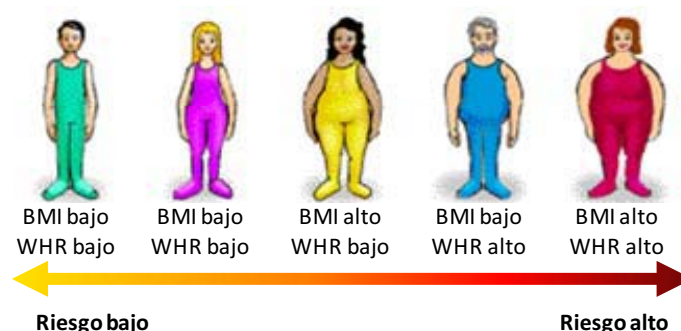


Figura 3. Riesgo de desarrollar otras enfermedades o factores de riesgo cardiovascular asociados a la obesidad. Unos niveles elevados del índice de masa corporal y/o del índice cintura-cadera darían lugar a un mayor riesgo de padecer una enfermedad cardiovascular. BMI, del inglés *Body mass index*; WHR, del inglés *Waist and hip ratio*.

1.2. OBESIDAD: FACTOR DE RIESGO CARDIOVASCULAR

Existen diversos tipos de enfermedades cardiovasculares: hipertensión arterial, enfermedad arterial coronaria, enfermedad valvular cardíaca, accidente cerebrovascular (trombosis o derrame cerebral), y fiebre reumática o enfermedad cardíaca reumática. Según la OMS las enfermedades cardiovasculares causan más de 17 millones de muertes en el mundo cada año, representan la mitad de todas las muertes en los países desarrollados, y son una de las principales causas de muerte en muchos países en vías de desarrollo. En conjunto, son la primera causa de muerte en adultos.

La obesidad es un factor de riesgo conocido para varias enfermedades como la diabetes mellitus tipo 2, la hipertensión arterial y las enfermedades cardiovasculares, entre otras (Tabla 1).

ENFERMEDADES RELACIONADAS CON EL EXCESO DE PESO	ENFERMEDADES RELACIONADAS CON LAS ALTERACIONES METABÓLICAS DE LA OBESIDAD
<ul style="list-style-type: none"> · Osteoartritis (rodillas, tobillos, columna lumbar) · Insuficiencia cardíaca congestiva · Insuficiencia respiratoria · Disnea (dificultad respiratoria) · Hernias (inguinales, incisionales) · Alteraciones psicológicas y psicosociales · Reflujo gastroesofágico · Enfermedades psiquiátricas (depresión, bulimia) · Intertrigo y micosis en pliegues cutáneos · Incontinencia urinaria (especialmente en la mujer) · Varices y edema en piernas · Pseudotumor cerebral · Síndrome de apnea-hipoapnea obstructiva del sueño 	<ul style="list-style-type: none"> · Diabetes mellitus tipo 2 (e intolerancia a la glucosa) · Resistencia a la insulina · Colelitiasis · Hipertensión arterial · Dislipemias · Infertilidad · Estrato-hepatitis no alcohólica · Síndrome de ovario poliquístico en mujeres en edad fértil · Gota (hiperuricemia) · Aumento de factores pro-trombóticos (fibrinógeno y PAI-1) · Litiasis biliar · Cáncer (endometrio, mama y colon) · Enfermedad cardiovascular aterosclerótica (coronaria, cerebral y periférica)

Tabla 1. Comorbilidades asociadas a la obesidad. Adaptación de Lavie y col. (Lavie *et al.*, 2009). PAI-1, *Plasminogen activator inhibitor-1*.

De hecho, la obesidad también es un factor de riesgo cardiovascular independiente (Tabla 2) (Hackam and Anand, 2003), y está asociado a un incremento en la morbilidad y mortalidad así como a una disminución de la esperanza de vida (Drenick *et al.*, 1980; Fontaine *et al.*, 2003). Por lo tanto, la obesidad puede predisponer a desarrollar enfermedad cardiovascular a través de sus factores de riesgo asociados más importantes como la dislipemia, hipertensión arterial, resistencia a la insulina, diabetes, y el estado proinflamatorio y proaterogénico al que se le asocia (Poirier *et al.*, 2006). El estudio INTERHEART, realizado en 30.000 pacientes de 52 países de los cinco continentes, mostró que la obesidad era uno de los factores de riesgo modificables con mayor peso en la determinación del infarto de miocardio en todo el mundo y confirmó la importancia de la adiposidad, en particular de la adiposidad abdominal, como factor de riesgo del infarto agudo de miocardio (Yusuf *et al.*, 2004). De hecho, recientemente se ha demostrado que los individuos obesos metabólicamente sanos no presentan un mayor riesgo cardiovascular cuando se comparan con individuos sanos o normopeso (Verburg *et al.*, 2010).

FACTORES DE RIESGO CARDIOVASCULAR	
MODIFICABLES	NO MODIFICABLES
Hipertensión	Antecedentes familiares de enfermedad cardiovascular
Obesidad	
Diabetes mellitus	Edad
Hipercolesterolemia	Género
Hipertrigliceridemia	Etnia
Niveles elevados de LDL	
Niveles bajos de HDL	
Dieta rica en grasas saturadas	
Tabaco	
Inactividad física	
Estrés	

Tabla 2. Factores de riesgo cardiovascular. Datos de la Federación Mundial del Corazón (<http://www.world-heart-federation.org>). HDL, del inglés *High density lipoprotein*; LDL, del inglés *Low density lipoproteins*.

Además, la obesidad forma parte del síndrome metabólico, también conocido como síndrome X, síndrome plurimetabólico, síndrome de insulinoresistencia, síndrome de Reaven o CHAOS en Australia. Se denomina síndrome metabólico a la conjunción de varias enfermedades o factores de riesgo en un mismo individuo que aumentan su probabilidad de padecer una enfermedad cardiovascular o diabetes (Figura 4) (Liese *et al.*, 1998). La presencia de este síndrome hace aumentar hasta 2 y 3 veces el riesgo de mortalidad debido a las enfermedades cardiovasculares (Isomaa *et al.*, 2001; Lakka *et al.*, 2002).

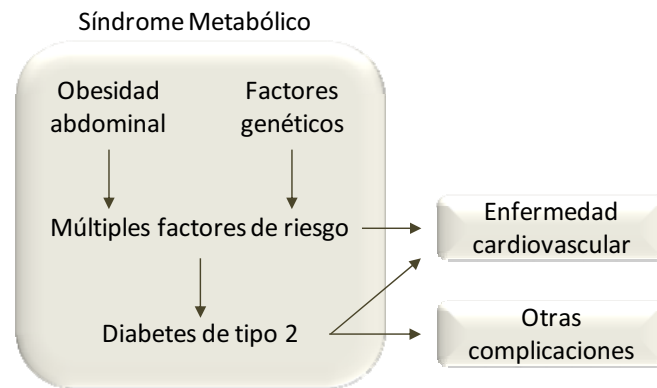


Figura 4. Evolución y patología del síndrome metabólico. Figura adaptada de Alegría y col. (Alegría Ezquerro *et al.*, 2008).

Desde la primera definición oficial del síndrome metabólico realizada por el grupo de trabajo de la OMS en 1999 (Alberti and Zimmet, 1998), se han propuesto diversas definiciones alternativas. Aunque todas las clasificaciones incluyen los componentes esenciales del síndrome, difieren en los detalles o en la inclusión de componentes difícilmente mesurables. Las más aceptadas han sido las elaboradas por el European Group for the Study of Insulin Resistance (EGIR) en 1999 (Balkau and Charles, 1999), el Adult Treatment Panel III (ATP-III) del National Cholesterol Education Program en 2001 (ATP-III, 2001), y la International Diabetes Federation (IDF) en 2005 (Alberti *et al.*, 2005) (Tabla 3), siendo las dos últimas las más utilizadas.

Como consecuencia de lo dicho, es evidente que el síndrome metabólico es un factor de riesgo de primer orden para las complicaciones aterotrombóticas. Por tanto, su presencia o ausencia debe considerarse como marcador de riesgo a largo plazo. En cambio, a corto plazo (5-10 años) el riesgo se calcula mejor con los baremos clásicos (Framingham, SCORE, REGICOR), pues incluyen la edad y el género, el colesterol total o las lipoproteínas de baja densidad (LDL, del inglés *Low density lipoproteins*), y el tabaquismo (Grundy, 2006).

OMS (1999)	EGIR (1999)	ATP-III (2001)	IDF (2005)
Diabetes o alteración de la tolerancia a la glucosa o resistencia frente a la insulina ^a	Resistencia a la insulina o hiperinsulinemia (únicamente a las personas no diabéticas)		Obesidad central (Perímetro de la cintura ^b : con especificidad respecto a los distintos grupos étnicos)
Más dos o más de los factores siguientes:	Más dos o más de los factores siguientes:	Tres o más de los factores siguientes:	Más dos cualquiera de los factores siguientes:
1. Obesidad: BMI > 30 kg/m ² o WHR > 0,9 en los varones o > 0,85 en las mujeres	1. Obesidad central: WC ≥ 94 cm en los varones o ≥ 80 cm en las mujeres	1. Obesidad central: WC > 102 cm en los varones o > 88 cm en las mujeres	1. Aumento de los TG: ≥ 1,7 mmol/l (150 mg/dl) o tratamiento específico de esta alteración lipídica
2. Dislipemia: TG > 1,7 mmol/l o HDL < 0,9 en los varones o < 1,0 en las mujeres	2. Dislipemia: TG > 2,0 mmol/l o HDL < 1,0	2. Hipertrigliceridemia: TG ≥ 1,7 mmol/l o < 1,3 mmol/l en las mujeres	2. Disminución del HDL < 1,03 mmol/l (40 mg/dl) en los hombres < 1,29 mmol/l (50 mg/dl) en las mujeres o tratamiento específico de esta alteración lipídica
3. Hipertensión: presión arterial ≥ 140/90 mmHg o tratamiento medicamentoso	3. Hipertensión: presión arterial ≥ 140/90 mmHg o tratamiento en los varones medicamentoso o ambos	3. Disminución del HDL: < 1,0 mmol/l	3. Aumento de la presión arterial Sistólica: ≥ 130 mmHg o diastólica: ≥ 85 mmHg o tratamiento de hipertensión diagnosticada previamente
4. Microalbuminuria	4. Glucemia en ayunas	4. Hipertensión: presión arterial ≥ 130/85 mmHg o tratamiento medicamentoso	4. Incremento de la glucemia ^c Glucemia en ayunas ≥ 5,6 mmol/l (100 mg/dl) o diabetes tipo 2 diagnosticada previamente Si la glucemia en ayunas en > 5,6 mmol/l o > 100 mg/dl, se recomienda fuertemente la realización de una OGTT, aunque no es necesaria para definir la presencia del síndrome metabólico
		5. Glucemia en ayunas ≥ 6,1 mmol/l	

Tabla 3. Definiciones del Síndrome Metabólico. Adaptación de Zimmet y col. (Zimmet *et al.*, 2005). ATP-III, *Adult Treatment Panel III*; EGIR: *European Group for the Study of Insulin Resistance*; IDF, *International Diabetes Federation*; OGTT, del inglés *Oral glucose tolerance test*; TG, del inglés *triglyceride*; WR, del inglés *waist circumference*. ^a Definida como el cuartil superior de la concentración de insulina en ayunas en personas no diabéticas. ^b Si el BMI es > 30 kg/m², se puede asumir la presencia de obesidad central y no es necesario medir el perímetro de la cintura. ^c En la práctica clínica también es aceptable la demostración de la alteración de la tolerancia a la glucosa, pero en todos los estudios epidemiológicos relativos a la prevalencia del síndrome metabólico se deben utilizar únicamente la glucemia en ayunas y la presencia de una diabetes previamente diagnosticada para evaluar este criterio. Las cifras de prevalencia que también incorporan los resultados de la glucemia a las 2h se pueden añadir como un hallazgo complementario.

1.2.1. LA PARADOJA DE LA OBESIDAD

A pesar del efecto descrito de la obesidad en la función cardiovascular, varios estudios han observado que en diferentes contextos de enfermedad, los pacientes con exceso de peso y obesidad de tipo I presentaban un menor riesgo de muerte y nuevos eventos cardiovasculares que los de peso normal y por debajo del peso normal (Horwich *et al.*, 2001; Curtis *et al.*, 2005). La aparente protección de la obesidad se observaba en los seguimientos de los pacientes que habían sufrido un evento o intervención coronaria (post-infarto, angioplastia, cirugía de revascularización), una insuficiencia cardíaca crónica o un accidente cerebrovascular. Este fenómeno se ha denominado “la paradoja de la obesidad”.

La mayor revisión del tema consideró 40 estudios que abarcaron 250.152 pacientes con enfermedad coronaria seguidos a 3.8 años (Romero-Corral *et al.*, 2006). Romero-Corral y col. concluyeron que el mayor riesgo de mortalidad lo tenían las personas delgadas, luego seguían los de peso normal y los muy obesos, y los grupos de mejor evolución eran los que presentaban sobrepeso u obesidad moderada (de tipo I) (Figura 5).

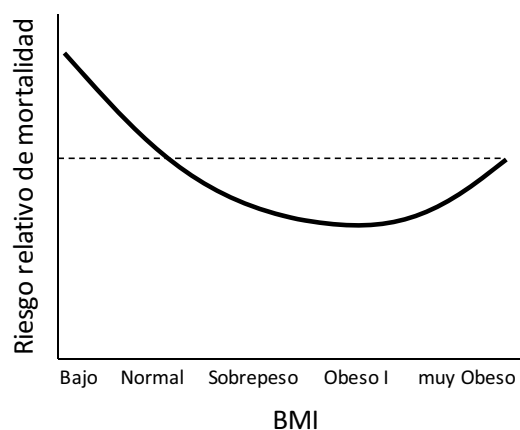


Figura 5. Relación entre las categorías de peso según el índice de masa corporal y el riesgo de muerte de cualquier causa. El estudio conllevó un seguimiento durante 3,8 años en más de 250.00 pacientes con coronariopatía. Como riesgo relativo 1 (línea punteada) se consideró al grupo de peso normal. Figura modificada de Romero-Corral y col. (Romero-Corral *et al.*, 2006). BMI, del inglés *Body mass index*.

Hoy en día existen varias hipótesis que intentan explicar la paradoja de la obesidad en la enfermedad coronaria:

- i. Comprensión inadecuada de factores confundidores: la presencia de otros factores de riesgo, como la edad, podrían adelantar la aparición de la enfermedad coronaria (Canto *et al.*, 2011; Boden *et al.*, 2007). No obstante, estadísticamente, la relación paradójica entre el BMI y la mortalidad no ha podido ser corregida por factores confundidores.
- ii. El índice de masa corporal no es un buen discriminador del porcentaje de peso graso: los hallazgos podrían ser explicados por la falta del poder discriminatorio del BMI para diferenciar entre la grasa corporal y la masa magra (Heitmann *et al.*, 2000). Pero esta no parecía ser la explicación en pacientes coronarios y fue refutada por un minucioso estudio prospectivo en el cual se estimó el porcentaje de grasa corporal con mediciones de los pliegues cutáneos y su distribución (Lavie *et al.*, 2011).
- iii. Tras un diagnóstico de enfermedad los pacientes con exceso de peso, aunque no modifiquen su peso, disminuyen su riesgo con tratamientos en mayor medida que los pacientes normopeso o delgados: el aumento de peso se asocia con el desarrollo de hipertensión arterial, dislipemia y diabetes y gran parte del riesgo asociado se explica por estos factores.

Definieron como tratamiento óptimo el uso de por lo menos tres de las cuatro medicaciones probadas que reducen la mortalidad alejada: aspirina, estatinas, betabloqueantes e inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina (Schenkeveld *et al.*, 2012).

- iv. La distribución de la grasa corporal tiene más importancia que su magnitud absoluta y contendría el verdadero mensaje de riesgo de la obesidad: mayor perímetro de cintura y mayor WHR se asocian con mayor riesgo cardiovascular (Yusuf *et al.*, 2005; Balkau *et al.*, 2007). Existen varias hipótesis para explicar este fenómeno dada la compleja actividad metabólica y hormonal de los adipocitos, que es muy diferente en la grasa visceral que en la subcutánea (McCarty, 2003; Manigrasso *et al.*, 2005). Sin embargo, Despres y col. aclara que no existe un valor de perímetro abdominal o WHR que se pueda considerar con independencia del nivel de peso corporal o BMI (Despres, 2011).
- v. La asociación entre obesidad, riesgo cardiovascular y mortalidad no es similar en diferentes grupos etarios y de riesgo y está mal comprendida: se ha visto que las curvas de la relación entre el BMI y la mortalidad en pacientes coronarios son prácticamente idénticas a las de los grupos etarios mayores

Sin embargo, este fenómeno no es homogéneo y se acentúa en los pacientes post-infarto y post-angioplastia. Además, estos estudios no son generalizables ya que son pequeños, llevados a cabo en centros individuales y están limitados a pacientes con fallo cardíaco severo y disfunción del ventrículo izquierdo (Horwich *et al.*, 2001; Osman *et al.*, 2000; Lavie *et al.*, 2003). Por lo que no queda claro si estos resultados son aplicables a una población con fallo cardíaco estable o función sistólica preservada.

Por lo tanto, falta por demostrar si la mejor supervivencia de los enfermos obesos se debe a que el propio exceso de grasa es el que aporta un efecto beneficioso directo, o si son los factores asociados a este exceso de grasa los responsables del beneficio. Hoy en día se acepta de forma universal la definición de obesidad como un BMI mayor de 30 kg/m², pero quizás un BMI elevado no sólo representa un exceso de grasa sino también otros factores potencialmente beneficiosos.

1.3. CIRUGÍAS PARA LA OBESIDAD

La base del tratamiento de la obesidad reside en realizar un plan dietético hipocalórico apropiado a cada persona junto con un programa de actividad física individualizado. En ocasiones, además es necesario un apoyo farmacológico adecuado y la necesidad de educación nutricional.

El fracaso repetido de los tratamientos convencionales en los pacientes con obesidad, sobre todo los pacientes con obesidad mórbida, junto con la presencia de problemas de salud causados por la obesidad ha impulsado el desarrollo de la cirugía bariátrica. Estas técnicas quirúrgicas ayudan a perder peso en gran medida limitando la cantidad de comida que cabe en el estómago, lo que hace que la persona se sienta saciada tras comer muy poco, pero a veces, puede provocar una malabsorción de los nutrientes que el cuerpo necesita (Livingston, 2002).

De entre los diferentes tipos de cirugía bariátrica, la elección de una u otra dependerá de las características clínicas del paciente, de las posibles complicaciones que presente así como de su comportamiento alimentario y perfil psicológico (Livingston, 2002). Hoy en día todas ellas pueden realizarse mediante cirugías mínimamente invasivas como la laparoscopia. Las técnicas más frecuentemente utilizadas son:

- Técnicas restrictivas: reducen el tamaño y la capacidad del estómago para obtener una sensación de saciedad precoz y duradera (balón intragástrico, banda gástrica ajustable, gastrectomía vertical o *sleeve gastrectomy*) (Figura 6A-C).
- Técnicas malabsortivas: inutilizan gran parte del intestino delgado para reducir la superficie absorptiva intestinal. Actualmente no se suelen utilizar debido al alto riesgo de complicaciones que aparecen con el tiempo (derivación biliopancreática con cruce duodenal) (Figura 6D).
- Técnicas mixtas: es una técnica restrictiva a la que se le asocia un procedimiento que genera malabsorción combinando y potenciando ambos efectos. Además de reducir el tamaño del estómago, se consigue una menor absorción de los alimentos ingeridos al reducir el intestino delgado funcional. Su eficacia es mayor que la de las técnicas restrictivas y posibilita una buena calidad de vida (Bypass gástrico en Y de Roux) (Figura 6E).

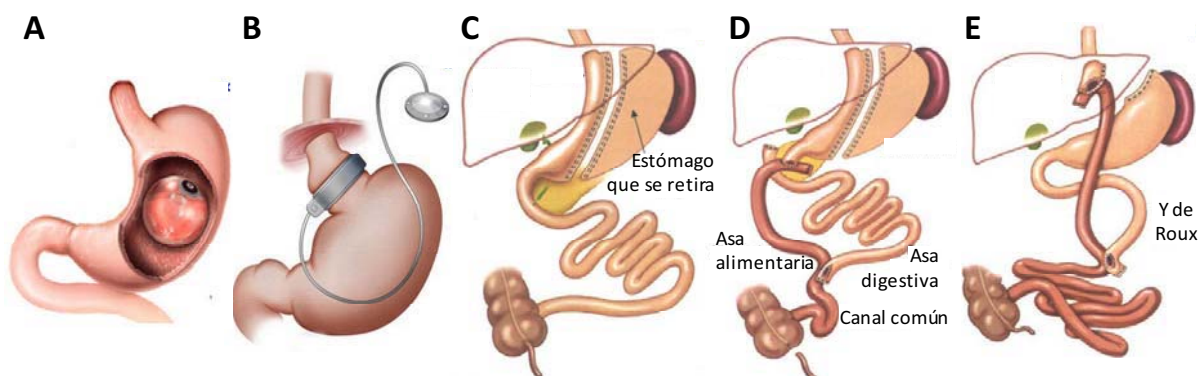


Figura 6. Ejemplos de cirugías bariátricas. (A) Balón intragástrico, (B) banda gástrica ajustable, (C) gastrectomía vertical, (D) derivación biliopancreática con cruce duodenal y (E) bypass gástrico en Y de Roux. Ilustraciones modificadas de Laparoscopic Associates of San Francisco (<http://www.lapsf.com/>).

2. EL TEJIDO ADIPOSO

El tejido adiposo es uno de los tejidos más abundantes del ser humano. Constituye entre el 15% y el 20% del peso corporal en los hombres, y entre el 20% y el 25% en las mujeres, y se encuentra ampliamente distribuido por distintas zonas del organismo. Es un tejido de origen mesenquimal especializado y constituido por el conjunto de tejido adiposo blanco y tejido adiposo pardo o marrón, ambos con una función, morfología y distribución diferentes (Figura 7).

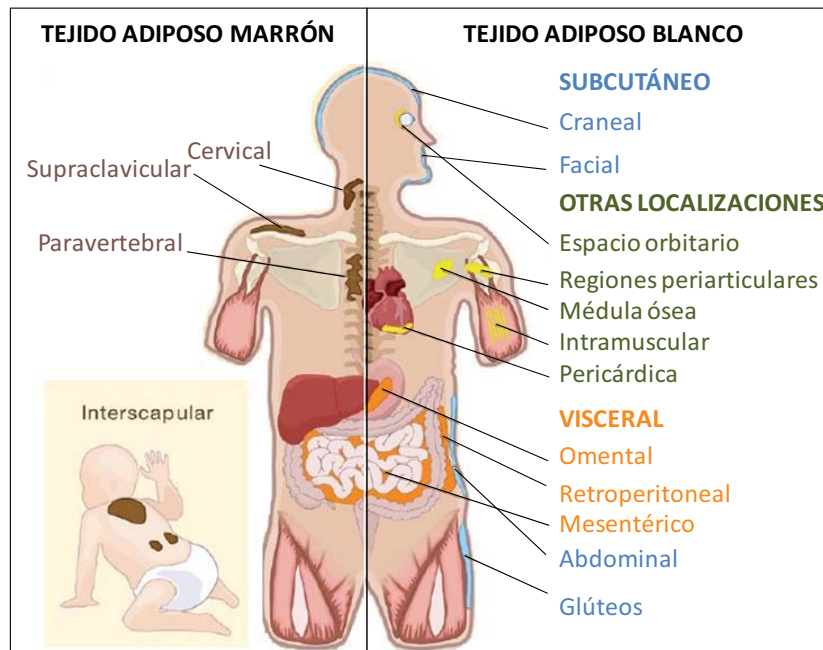


Figura 7. Distribución de los depósitos de tejido adiposo en humanos. Figura adaptada de Gesta y col. (Gesta *et al.*, 2007).

El tejido adiposo juega un papel crucial en la regulación y la disfunción patológica de la homeostasis energética. En mamíferos, la homeostasis energética es un compromiso entre el aporte y el gasto energético y, en buena parte, el equilibrio se consigue a través de la respuesta coordinada entre el sistema nervioso y los tejidos adiposos, siendo estos últimos la fuente principal de reserva del organismo (tejido adiposo blanco) y el sistema de disipación energética (tejido adiposo marrón). En ambos tejidos encontramos que la célula principal es el adipocito, entre uno y dos tercios del total, y el resto de tejido está compuesto por diferentes tipos celulares que presentan distintas funciones. Sin embargo, mientras que los adipocitos del tejido adiposo blanco se caracterizan por presentar una única vacuola lipídica, los adipocitos del tejido adiposo marrón son multiloculares y poseen una gran cantidad de mitocondrias que le confieren su color característico (Trujillo and Scherer, 2006).

2.1. TEJIDO ADIPOSO BLANCO

El tejido adiposo blanco constituye el mayor componente de tejido adiposo en el organismo y está situado estratégicamente debajo de la piel y alrededor de los órganos vitales para protegerlos de infecciones o traumatismos. Su función principal es la de regular la homeostasis energética del organismo bajo el control del sistema nervioso y endocrino. De este modo, en períodos de exceso calórico el tejido adiposo almacena ácidos grasos en forma de triglicéridos y, en momentos de demanda energética, los libera a la circulación para ser usados como fuente energética por otros tejidos como el hígado, el riñón, el músculo esquelético y el miocardio (Wronska and Kmiec, 2012). Sin embargo, actualmente el tejido adiposo blanco es reconocido como un órgano multifuncional ya que, además de su función energética, actúa como órgano endocrino y como reservorio de células madre mesenquimales (MSC, del inglés *Mesenchymal stem cells*).

2.1.1. ESTIRPES CELULARES DEL TEJIDO ADIPOSO

El tejido adiposo está constituido por adipocitos maduros y el tejido intercelular o fracción vascular del estroma (SVF, del inglés *Stromal vascular fraction*).

▪ ADIPOCITOS

Los adipocitos constituyen las células más abundantes del tejido adiposo y son los encargados de almacenar energía en forma de lípidos, fundamentalmente triglicéridos. Están formados por una gran vacuola citoplasmática única, compuesta principalmente por triglicéridos y ésteres de colesterol, que desplaza al resto de los orgánulos a la periferia de la célula. Además, están adaptados para almacenar y liberar ácidos grasos bajo la forma de triglicéridos, lo que conlleva que en función del estado nutricional los adipocitos pueden modificar su tamaño entre 25 y 200 μm (Figura 8).

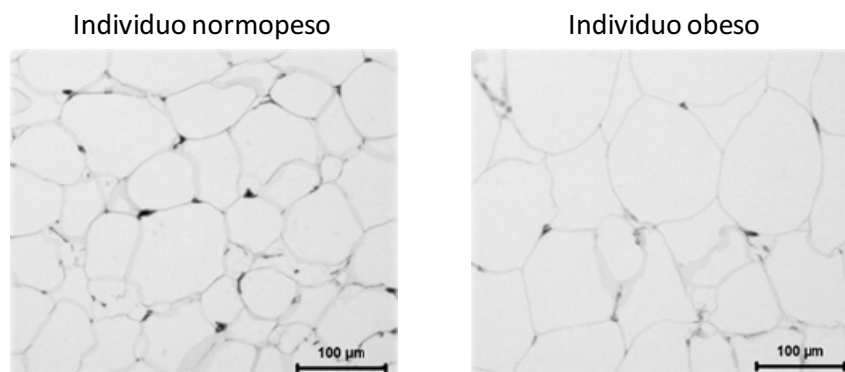


Figura 8. Cortes histológicos representativos de tejido adiposo blanco subcutáneo abdominal de individuos delgados y obesos. Foto de Goossens G H y col. (Goossens *et al.*, 2011).

Los adipocitos contienen la maquinaria necesaria para el metabolismo de los lípidos. Llevan a cabo la lipogénesis, la síntesis de triglicéridos, y también realizan la lipólisis, proceso mediante el cual los triglicéridos son convertidos en glicerol y ácidos grasos libres que pasan al torrente sanguíneo donde son dirigidos hacia los tejidos para proporcionar la energía necesaria (Figura 9). Ambos procesos están fuertemente regulados por factores hormonales como la insulina o las catecolaminas (Jaworski *et al.*, 2007). Una alteración de estas vías y, por consiguiente, un aumento de los ácidos grasos circulantes asociado a un aumento de peso desencadena una resistencia a la insulina. Este efecto se debe a que además de tener una función como moléculas energéticas, los ácidos grasos actúan también como señales reguladoras de la expresión génica de proteínas implicadas en el metabolismo lipídico (Duplus *et al.*, 2000), crean un estado protrombótico y se asocian con procesos inflamatorios (Sheehan and Jensen, 2000). Es por ello que uno de los mayores vínculos entre la obesidad y el desarrollo del síndrome metabólico, la enfermedad cardiovascular y el cáncer es el exceso de ácidos grasos circulantes (lipotoxicidad).

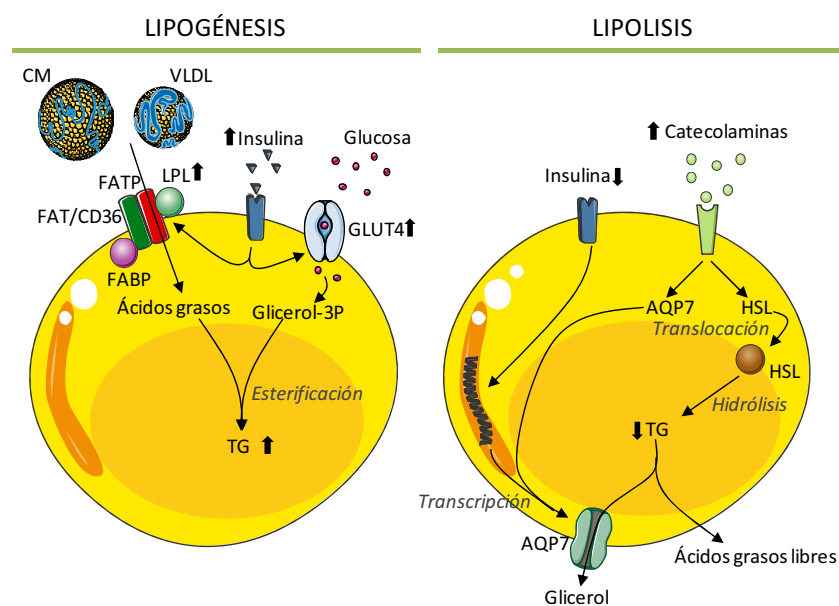


Figura 9. Esquema que ilustra los procesos de lipogénesis y lipólisis que se llevan a cabo en los adipocitos maduros. Después de una comida y un aumento de insulina en sangre, ésta activa la lipogénesis en los adipocitos. En este proceso el adipocito, por medio del enzima *lipoprotein lipase* (LPL), degrada los triglicéridos (TG, del inglés *Triglyceride*) de los quilomicrones (CM, del inglés *Chylomicron*) y de las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL, del inglés *Very low-density lipoprotein*) a ácidos grasos. Éstos entran en el adipocito para ser esterificados con el glicerol-3P y sintetizar así los TG que se almacenarán en la vacuola lipídica. En el adipocito, la insulina no solo estimula la síntesis de la LPL, sino que también estimula la captación y el metabolismo de la glucosa a glicerol-3P. Contrariamente, durante la lipólisis los TG almacenados son movilizadoss para producir ácidos grasos libres y glicerol y cubrir así las necesidades energéticas del organismo. Mediante hormonas catabólicas, secretadas en respuesta a bajos niveles de glucosa sanguínea, se activa la síntesis y movilización de la lipasa sensible a hormonas (HSL, *Hormone-sensitive lipase*) del citosol a la superficie de la vacuola lipídica donde podrá hidrolizar a los TG. Los ácidos grasos producidos son secretados a la circulación como ácidos grasos libres donde serán transportados por la albúmina hasta los órganos de destino donde serán oxidados para producir energía. Igualmente, el glicerol derivado de la lipólisis también es liberado a la circulación para ser utilizado por el hígado como fuente de carbono (Wang *et al.*, 2008; Jaworski *et al.*, 2007). AQP7, *aquaporin-7*; FABP, *Fatty-acid-binding proteins*; FAT/CD36, *Fatty acid translocase*; FATP, *Fatty-acid transport protein*; Glycerol-3P, *Glycerol 3-phosphate*; Glut4, *Glucose transporter type 4*.

En situaciones donde se da un mayor consumo de calorías respecto a su gasto, se produce un estado metabólico en el que se promueve la hipertrofia (aumento del tamaño) y la hiperplasia (incremento del número) de los adipocitos (Shepherd *et al.*, 1993). Esto último implica la movilización de las células madre hacia el linaje adipocítico (adipogénesis). Los adipocitos nuevos o de pequeño tamaño son más insulino-sensibles, y presentan una gran capacidad de captar ácidos grasos libres y triglicéridos presentes en el período postprandial (Ibrahim, 2010). A medida que los adipocitos aumentan de tamaño (hipertrofia), se vuelven disfuncionales, pierden su capacidad protectora contra la lipotoxicidad sistémica, y la grasa empieza a acumularse ectópicamente. Estos adipocitos distendidos se hacen resistentes a la insulina, hiperlipolíticos y resistentes a las señales anti-lipolíticas de la insulina.

Otra función muy importante llevada a cabo por los adipocitos es la de célula endocrina. En los adipocitos se sintetizan, metabolizan y secretan un gran número de hormonas que participan en la regulación del metabolismo y la homeostasis energética del organismo. Esta función está más ampliamente explicada en el apartado 2.1.3.

▪ **FRACCIÓN VASCULAR DEL ESTROMA (SVF)**

El SVF está constituida por las células que quedan una vez se han eliminado los adipocitos maduros del tejido adiposo. Aunque las células que forman el SVF no están del todo definidas, se sabe que incluye las células vasculares, células sanguíneas y células precursoras de adipocitos (Gimble *et al.*, 2007). Todas estas células ejercen un gran número de funciones importantes para el mantenimiento de la homeostasis del tejido adiposo. De hecho, la composición del SVF del tejido adiposo puede variar en función del tipo de tejido adiposo, así como del estado fisiológico o patológico en el que se encuentre. Varias de las diferencias encontradas en la expresión genética entre los diferentes tipos de tejido adiposo se deben en parte al contenido en el SVF (Trujillo and Scherer, 2006).

Los pericitos, junto con las células endoteliales y las células musculares lisas forman la vasculatura del tejido adiposo. La extensión de esta red capilar y las características de las células endoteliales son determinantes para el desarrollo de procesos como el crecimiento, la funcionalidad y el desarrollo del tejido adiposo (Rutkowski *et al.*, 2009; Rupnick *et al.*, 2002). De hecho, la secreción de factores proangiogénicos por parte de los adipocitos y de otras células del SVF contribuyen a que el tejido esté generosamente irrigado.

Otro tipo celular que forma parte del SVF son las células sanguíneas: monocitos, macrófagos, eritrocitos, linfocitos, eosinófilos, neutrófilos y mastocitos. Se ha observado que el tejido adiposo ejerce un gran control en el metabolismo del organismo a través de las células del sistema inmune

residentes en él. En individuos delgados, 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, adquieren un fenotipo proinflamatorio, y liberan un gran número de citoquinas encargadas de reclutar y activar a otras células del sistema inmune e inducir una resistencia a la insulina en el tejido adiposo (Schipper *et al.*, 2012). Los macrófagos son una de las células que juega un papel más importante en la adquisición del estado proinflamatorio crónico de bajo grado que se caracteriza en los sujetos obesos. Esto se debe a que, durante la expansión del tejido adiposo que ocurre en la obesidad, se produce un incremento de macrófagos M1 (fenotipo proinflamatorio) que suelen ser reclutados por tejidos dañados, en vez de los macrófagos M2 (fenotipo antiinflamatorio) que son los que residen normalmente en el tejido adiposo (Figura 10) (Lumeng *et al.*, 2007). Estudios recientes han demostrado que los macrófagos infiltrados son los encargados de secretar la mayoría de las citoquinas proinflamatorias que encontramos en el tejido adiposo obeso (Weisberg *et al.*, 2003; Fain, 2006).

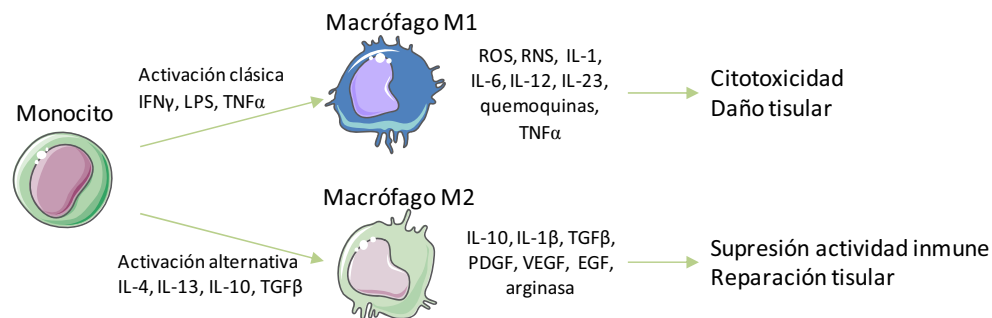


Figura 10. Tipos de macrófagos. Las citoquinas producidas en el tejido adiposo blanco dan lugar a macrófagos con diferentes fenotipos. Mientras que los macrófagos M1 (activados clásicamente) presentan un fenotipo citotóxico y proinflamatorio, los macrófagos M2 (activados alternativamente) inhiben la respuesta inmune e inflamatoria y promueven la angiogénesis y reparación tisular. EGF, *epidermal growth factor*; IFN γ , *Interferon γ* ; IL, *interleukins*; LPS, lipopolisacárido del inglés *Lipopolysaccharide*; PDGF, *platelet-derived growth factor*; RNS, del inglés *reactive nitrogen species*; ROS, del inglés *reactive oxygen species*; TGF β , *transforming growth factor β* ; TNF α , *tumor necrosis factor α* VEGF, *vascular endothelial growth factor*.

Por último, en el SVF encontramos las células madre derivadas del tejido adiposo (ASC, del inglés *Adipose-derived stromal/stem cells*) y los preadipocitos. Estas poblaciones celulares son las encargadas de mantener la renovación de la población de adipocitos en condiciones normales y están implicados en la expansión del tejido adiposo que se da en la obesidad. Las ASC son las MSC adultas que residen en el estroma vascular del tejido adiposo y que, bajo determinados estímulos inductores del proceso de diferenciación, se convierten en preadipocitos una vez son comprometidas hacia el linaje adipocítico (Rodríguez *et al.*, 2005a) (Figura 11). Las diferencias entre estos dos grupos celulares no están muy definidas. Tanto las ASC como los preadipocitos presentan una morfología

muy similar. Sin embargo, mientras que las ASC pueden diferenciarse a otros linajes, como a osteocitos, condrocitos y miocitos, y presentan una gran capacidad de autorenovación, los preadipocitos han perdido estas capacidades y solo pueden dar lugar a adipocitos maduros (Cawthorn *et al.*, 2012).

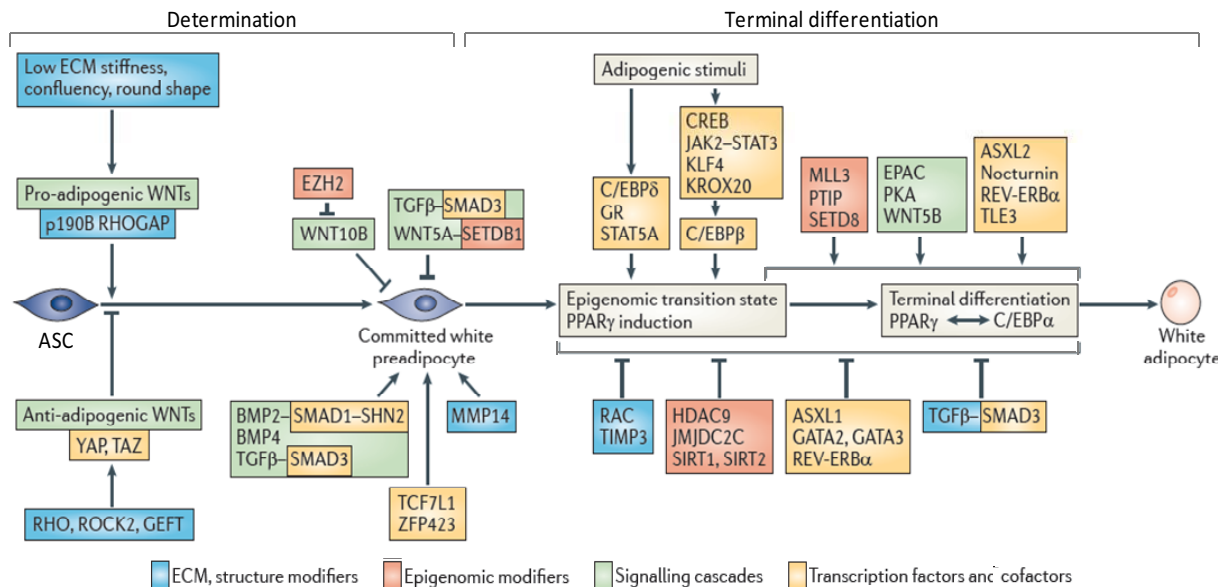


Figura 11. Evolución de la diferenciación adipogénica. La adipogénesis es el proceso por el cual se generan adipocitos maduros a partir de células progenitoras. Este proceso se puede dividir en dos fases: (i) Determinación: las ASC se comprometen a preadipocitos y pierden su capacidad multipotencial; y (ii) diferenciación: los preadipocitos terminan de diferenciarse a adipocitos maduros. Este proceso está estrechamente regulado a nivel molecular por un gran número de vías de señalización y diversos factores de transcripción (Tang and Lane, 2012). Figura modificada de Cristancho y col. (Cristancho and Lazar, 2011). ASC, del inglés *Adipose-derived stromal/stem cells*; ASXL2, *Additional sex combs like 2*; BMP, *Bone morphogenetic protein*; C/EBP, *CCAAT/enhancer-binding protein*; CREB, *cAMP response element-binding*; ECM, del inglés *Extracellular matrix*; EPAC, *Exchange proteins directly activated by cAMP*; EZH2, *Enhancer of zeste homologue 2*; GATA, *GATA-binding protein*; GEF, *Guanine nucleotide exchange factor T*; GR, *Glucocorticoid receptor*; HDAC9, *Histone deacetylase 9*; JAK2, *Janus kinase 2*; JMJD2C, *Jumonji domain-containing 2C*; KLF4, *Krüppel-like factor 4*; KROX20, *Early growth response 2 (EGR2)*; MLL3, *Myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukaemia 3*; MMP14, *Matrix metalloproteinase 14*; p190 RHO GAP, *p190B RHO GTPase-activating protein*; PKA, *Protein kinase A*; PPARγ, *Peroxisome proliferator-activated receptor-γ*; PTIP, *PAX transactivation domain-interacting protein*; RAC, *Rho family of GTPases*; REV-ERBα, *Nuclear receptor subfamily 1, group D, member 1 (NR1D1)*; ROCK2, *RHO-associated kinase 2*; SETD8, *SET domain-containing 8*; SETDB1, *SET domain bifurcated 1*; SHN2, *Schnurri 2*; SIRT, *sirtuin*; SMAD, *SMAD family member*; STAT, *Signal transducer and activator of transcription*; TAZ, *Transcriptional co-activator with PDZ-binding motif*; TCF7L1, *T cell-specific transcription factor 7-like 1*; TGFβ, *Transforming growth factor-β*; TIMP3, *Tissue inhibitor of MMPs 3*; TLE3, *Transducin-like enhancer 3*; WNT, *Wingless-type MMTV integration site family*; YAP, *Yes-associated protein*; ZFP423, *Zinc-finger protein 423*.

2.1.2. TIPOS DE TEJIDOS ADIPOSOS BLANCOS

El tejido adiposo blanco se encuentra distribuido a lo largo de todo el organismo. Sus mayores depósitos se encuentran en la zona visceral o intra-abdominal recubriendo el omento, los intestinos y la zona perirrenal; y a nivel subcutáneo en los glúteos, muslos y abdomen. Igualmente, el tejido adiposo blanco también se puede encontrar en el espacio orbitario, en la cara, en el pericardio, en las extremidades y en la médula ósea (Figura 7) (Gesta *et al.*, 2007). Cada subgrupo de tejido adiposo

presenta funciones específicas y diferentes. Sin embargo, son los tejidos adiposos subcutáneo y visceral los dos tipos de tejido adiposo blanco mejor caracterizados debido a su importante contribución en diversas enfermedades (Tabla 4).

En condiciones normales el 80% del tejido adiposo blanco del cuerpo se encuentra en las zonas subcutáneas, mientras que el tejido adiposo visceral representa entre el 10-20% del tejido adiposo blanco en hombres y el 5-8% en mujeres (Wajchenberg, 2000). La situación anatómica de ambos tejidos tiene un gran efecto en su función endocrina. Mientras los factores liberados por el tejido adiposo subcutáneo son secretados a la circulación sistémica, los factores derivados del tejido adiposo visceral se secretan al sistema portal y van directamente al hígado (Rytka *et al.*, 2011). Como consecuencia, las adipoquinas, citoquinas y ácidos grasos liberados por el tejido adiposo visceral tienen un efecto directo en el metabolismo hepático.

Además, tanto el tejido adiposo subcutáneo como el tejido adiposo visceral presentan diferencias en el perfil de expresión de adipoquinas (Kershaw and Flier, 2004), en las funciones metabólicas del tejido (Gil *et al.*, 2011), así como en la densidad de la vasculatura e innervación. El tejido adiposo visceral presenta una mayor cantidad células endoteliales presentando un mayor potencial angiogénico que el tejido adiposo subcutáneo, y un perfil inflamatorio más acentuado (Villaret *et al.*, 2010).

FUNCIÓN	DIFERENCIA REGIONAL ENTRE TEJIDOS ADIPOSOS
Producción de leptina y adiponectina	subcutáneo > visceral
Producción de angiotensinógeno, PAI-1, resistina	visceral > subcutáneo
Producción de citoquinas proinflamatorias	visceral > subcutáneo
Contenido en células inflamatorias	visceral > subcutáneo
Vascularización e innervación	visceral > subcutáneo
Respuesta lipolítica a catecolaminas	visceral > subcutáneo
Captación de glucosa	visceral > subcutáneo
Liberación de ácidos grasos libres	visceral > subcutáneo
Efecto antilipolítico de la insulina	subcutáneo > visceral
Absorción de ácidos grasos y triglicéridos	subcutáneo > visceral
Receptor de insulina	visceral > subcutáneo
Afinidad del receptor de insulina	subcutáneo > visceral
Receptores β -adrenérgicos	visceral > subcutáneo
Receptores α -adrenérgicos	subcutáneo > visceral
Receptores de estrógenos	subcutáneo > visceral
Receptores de glucocorticoides	visceral > subcutáneo
Receptores androgénicos	visceral > subcutáneo
Diferenciación preadipocitos	subcutáneo > visceral
Actividad de 11 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa	visceral > subcutáneo

Tabla 4. Comparación funcional entre el tejido adiposo subcutáneo y el visceral. Adaptación de Ibrahim y col. (Ibrahim, 2010). PAI-1, *Plasminogen activator inhibitor-1*.

El tejido adiposo subcutáneo se caracteriza por presentar adipocitos pequeños los cuales tienden a ser más sensibles a la insulina y absorber rápidamente los ácidos grasos y los triglicéridos presentes en la circulación durante el período postprandial (Ibrahim, 2010). Sin embargo, el tejido adiposo

visceral está formado por adipocitos de mayor tamaño que han disminuido su capacidad de almacenamiento, son más insulino-resistentes y más sensibles a estímulos adrenérgicos. Éstos exhiben una tasa lipolítica y de resíntesis (*turnover*) de los ácidos grasos mayor que los adipocitos subcutáneos, y presentan una menor respuesta a la actividad antilipolítica de la insulina (Ibrahim, 2010). Como consecuencia, los adipocitos viscerales liberan una mayor cantidad de ácidos grasos a la circulación. De la misma manera, el tejido adiposo visceral libera más IL-6 que el tejido adiposo subcutáneo, una citoquina proinflamatoria que inhibe la respuesta a la insulina, y niveles más bajos de adiponectina y leptina que están implicadas en la sensibilidad de la insulina (Bahceci *et al.*, 2007). Estas diferencias proporcionan una relación entre el exceso de tejido adiposo visceral y el estado proinflamatorio y de resistencia a la insulina que se desarrolla como consecuencia.

La acumulación del tejido adiposo subcutáneo representa la respuesta fisiológica normal a situaciones con un exceso en la ingesta (dieta alta en calorías) y un gasto energético limitado (inactividad física), actuando como “sumidero de energía”. Individuos que presentan una obesidad periférica (distribución subcutánea) no presentan las complicaciones médicas características de la obesidad. Pero cuando el tejido adiposo subcutáneo presenta un déficit en esta capacidad de almacenaje, incrementa el flujo de ácidos grasos circulantes que da lugar a un aumento en la acumulación de grasa alrededor de diversos órganos (depósito de grasa ectópico) (Freedland, 2004).

Contrariamente al tejido adiposo subcutáneo, el aumento de tejido adiposo visceral (obesidad central) se asocia con un estado de hiperglicemia, hiperinsulinemia, hipertrigliceridemia, hipercolesterolemia, disminución en los niveles circulantes de HDL, disminución de la tolerancia a la glucosa, aumento de lipoproteínas ricas en apolipoproteína-B (VLDL y LDL) y esteatosis hepática. Todas estas situaciones son características del síndrome de resistencia a la insulina, por lo que el riesgo de desarrollar diabetes es mayor en individuos con un exceso de tejido adiposo visceral (Ibrahim, 2010) (Figura 12). Es por ello que hoy en día el tamaño de la cintura, considerado como un indicador de la cantidad de grasa visceral, es un elemento importante en el diagnóstico del síndrome metabólico y se ha identificado como un factor de riesgo independiente para otras enfermedades como las enfermedades cardiovasculares, los accidentes cerebrovasculares, la hipertensión, y la enfermedad del hígado graso no alcohólico (Dobbelsteyn *et al.*, 2001; Kanai *et al.*, 1990; Ayonrinde *et al.*, 2011).

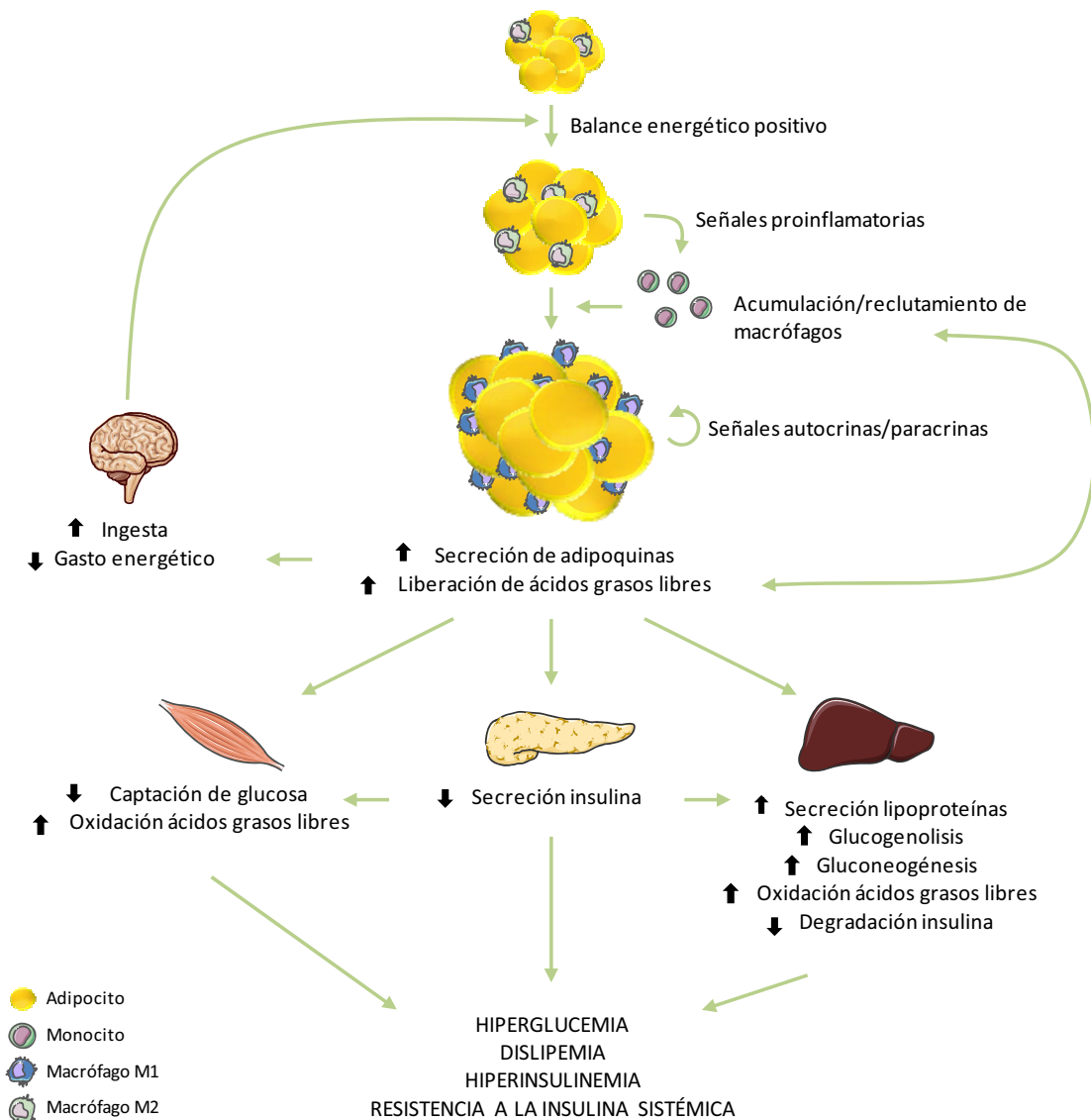


Figura 12. Desarrollo de la resistencia a la insulina en individuos obesos. En un estado de obesidad, el tejido adiposo blanco se encuentra bajo un constante estrés metabólico que desencadena una respuesta proinflamatoria y un reclutamiento de macrófagos. En este estado, los adipocitos liberan de forma disregulada citoquinas, adipoquinas y ácidos grasos libres que actúan de forma autocrina y paracrina amplificando este estado proinflamatorio y desarrollándose una resistencia a la insulina. Estos factores liberados también actúan en otros tejidos generando un acúmulo lipídico ectópico, un estado proinflamatorio, y una disminución de la sensibilidad a la insulina que acaba alterando el metabolismo de estos tejidos. Como resultado, estos órganos desencadenan una resistencia a la insulina local. Figura adaptada de Galic y col. (Galic *et al.*, 2010).

2.1.3. FACTORES LIBERADOS POR EL TEJIDO ADIPOSO BLANCO

Hoy en día se reconoce que el tejido adiposo es un órgano endocrino debido a su importante implicación en la regulación del metabolismo y la homeostasis corporal (Galic *et al.*, 2010). En 1987 se identificó al tejido adiposo como el lugar de mayor metabolización de las hormonas esteroideas (Siiteri, 1987) y de producción de la adiposina, un factor endocrino que se encontraba disminuido en roedores obesos (Flier *et al.*, 1987). La posterior identificación y caracterización de la leptina en 1994

estableció de manera definitiva la idea del tejido adiposo como un órgano endocrino (Zhang *et al.*, 1994), y desde entonces se han identificado más de 100 de estos factores secretados. Estos péptidos bioactivos secretados, los cuales fueron denominados bajo el término común de adipocitoquinas o adipoquinas (Kim and Moustaid-Moussa, 2000), incluyen más de 50 citoquinas, quimiocinas, factores hormonales y otros mediadores (Tabla 5) (Ronti *et al.*, 2006). Sin embargo, muchos de estos factores liberados por el tejido adiposo no sólo son secretados por el adipocito sino que son secretados también por las células que componen el SVF, como los macrófagos o las ASC. Es por ello que se propuso utilizar el término de adipoquinas sólo para aquellas proteínas que se sintetizan y se secretan exclusivamente por los adipocitos maduros (Trayhurn and Wood, 2004).

Adipoquinas	Función	Célula secretora	Regulación metabólica
11b-Hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 1	Metabolismo esteroideo	Adipocitos, preadipocitos	↑ obesidad
Ácidos grasos libres	Metabolismo lipídico	Adipocitos	↑ obesidad
Adiponectina	Aumenta la sensibilidad a la insulina, inflamación y aterosclerosis	Adipocitos	↓ obesidad
Adipsina y Proteína estimuladora de acilación	Estrés y respuesta inmune	Adipocitos, macrófagos M2	↑ obesidad
Angiotensinógeno	Homeostasis vascular	Adipocito, SVF	↑ obesidad
Apelina	IR	Adipocito, SVF, macrófagos	↑ obesidad
Aromatasa	Metabolismo lipídico	Adipocito, ASC, macrófagos	↑ obesidad
Factor Crecimiento parecido Insulina tipo 1	Metabolismo lipídico, IR	Adipocito, preadipocito, ASC	
Factor de necrosis tumoral-α	Inflamación, aterosclerosis, IR	Adipocitos, macrófagos M1	↑ obesidad
Factor inhibidor de la migración de macrófagos	Inflamación	Adipocitos, ASC, células SI	↑ obesidad
Factor-beta de crecimiento transformador	Adhesión y migración celular, crecimiento y diferenciación	Adipocitos, SVF, ASC	↑ obesidad
Hormonas esteroideas	Metabolismo lipídico, IR	Adipocitos, preadipocitos	↑ obesidad
Inhibidor-1 del activador del plasminógeno	Homeostasis vascular	Adipocitos, SVF	↑ obesidad
Interleuquina-1	Inflamación, IR	Macrófagos M1	↑ obesidad
Interleuquina-6	Inflamación, aterosclerosis, IR	Adipocito, SVF	↑ obesidad
Interleuquina-8	Proaterogénesis	Adipocito, SVF	↑ obesidad
Interleuquina-10	Inflamación, IR	Adipocitos, macrófagos M2	↑ obesidad, ↓ MetS
Leptina	Ingesta de alimentos, reproducción, angiogénesis y sistema inmune	Adipocitos	↑ obesidad
Lipasa sensible a hormona	Metabolismo lipídico	Adipocitos	↓ obesidad
Lipoproteína lipasa	Metabolismo lipídico	Adipocitos	↑ obesidad
Metalotioneína	Estrés y respuesta inmune	Adipocitos, SVF	↑ obesidad
Monobutirina	Angiogénesis	Adipocitos	↑ obesidad
Omentina	IR	SVF, macrófagos	↓ obesidad
Perilipina	Metabolismo lipídico	Adipocitos	↑ obesidad
Prostaglandinas (PGE2, prostaciclina, PG2Fα)	Flujo sanguíneo, lipólisis, diferenciación celular	Adipocitos, ASC	↑ obesidad
Proteína C reactiva	Inflamación, aterosclerosis, IR	SVF	↑ obesidad
Proteína de unión a ácidos grasos	Metabolismo lipídico	Adipocitos, macrófagos	↑ obesidad
Proteína quimiatrayente de monocitos-1	Proaterogénesis, IR	Adipocitos, macrófagos M1	↑ obesidad
Proteína transportadora de ésteres de colesterol	Metabolismo lipídico	Preadipocitos, adipocitos	↑ obesidad
Proteína transportadora del retinol	Metabolismo lipídico	Adipocitos	variable en obesidad
Resistina	Inflamación, IR	Adipocitos, macrófagos M2	variable en obesidad
Trombospondina	Angiogénesis	Adipocitos	↑ obesidad
Visfatina	IR	Adipocitos, preadipocitos, neutrófilos	variable en obesidad
Glicoproteína zinc-alfa 2	Metabolismo lipídico, cáncer y caquexia	Adipocitos, SVF	↓ obesidad

Tabla 5. Factores secretados por el tejido adiposo blanco. Adaptación de Ronti y col. (Ronti *et al.*, 2006), Balistreri y col. (Balistreri *et al.*, 2010) y Wellen y col. (Wellen and Hotamisligil, 2005). ASC, del inglés *Adipose-derived stromal/stem cells*; IR, del inglés *Insulin resistance*; PG, *Prostaglandin*; MetS, *Metabolic syndrome*; SVF, del inglés *stromal vascular fraction*.

A través de todos estos factores secretados, el tejido adiposo participa en la regulación autocrina y paracrina del propio tejido, y tiene efectos en la función de otros órganos como el músculo, el páncreas, el hígado y el cerebro. Además, el tejido adiposo se encarga de regular la homeostasis energética y el peso corporal, la sensibilidad a la insulina, y varias de las funciones del sistema inmune, vascular y reproductor (Tabla 5) (Ronti *et al.*, 2006; Balistreri *et al.*, 2010). El conocimiento de esta nueva función endocrina por parte del tejido adiposo ayudó a la comprensión de la relación fisiopatológica entre el exceso de la grasa del cuerpo y los estados patológicos que se le asocian, ya que la obesidad y/o el síndrome metabólico provocan una desregulación de los niveles secretados de estas moléculas (Wellen and Hotamisligil, 2005; Tesauro *et al.*, 2011).

2.1.4. REMODELADO DEL TEJIDO ADIPOSO BLANCO

La reparación de un tejido dañado es un proceso biológico fundamental que permite, de una forma ordenada, la substitución de las células muertas o dañadas en respuesta a procesos inflamatorios. El proceso de reparación empieza con una fase regenerativa, en la cual las células dañadas son reemplazadas por otras sanas y del mismo tipo celular. Si el daño persiste, esta fase inicial se continúa con una fase de acumulación fibrosa en la cual el tejido conectivo substituye al tejido parénquima. A pesar de que este proceso de remodelado se inicia de una manera beneficiosa, puede volverse patogénico produciendo un continuo remodelado tisular y la formación de una cicatriz tisular permanente que provocará una disfunción del órgano.

Los adipocitos están rodeados por una densa matriz extracelular que no sólo sirve de soporte mecánico sino que también regula los procesos fisiológicos y patológicos del tejido adiposo, como el remodelado (Khan *et al.*, 2009). El remodelado del tejido adiposo es un proceso que ocurre normalmente de manera continuada debido a su capacidad de respuesta rápida y dinámica a las variaciones nutricionales. Sin embargo, este proceso se vuelve patológico cuando existe una gran expansión del tejido, como ocurre durante la obesidad. Como consecuencia, disminuye el remodelado angiogénico, aumenta la síntesis de matriz extracelular, la infiltración de células inmunológicas y, finalmente, permanece una respuesta proinflamatoria (Sun *et al.*, 2011). Un factor limitante en la expansión del tejido adiposo blanco es la angiogénesis, ya que aporta oxígeno, nutrientes, factores de crecimiento, hormonas, células inflamatorias y células madre que ayudan a mantener la homeostasis del tejido (Cao, 2007).

No obstante, no todas las expansiones del tejido adiposo son necesariamente “patológicas”. Una expansión “sana” ocurre cuando el tejido aumenta de tamaño a través de la diferenciación de los precursores adipogénicos, se incrementa la vascularización y existe una inducción mínima de la matriz extracelular y de la inflamación. Por el contrario, la expansión “patológica” ocurre cuando hay

un rápido y gran crecimiento de los adipocitos ya existentes, un aumento de la infiltración de los macrófagos, un desarrollo limitado de la vasculatura así como una fibrosis masiva (Sun *et al.*, 2011). Como consecuencia se crea un estado proinflamatorio crónico que resulta en el desarrollo de una resistencia a la insulina sistémica.

La expansión “sana” del tejido adiposo correspondería con el fenotipo de obesidad metabólicamente sana, la cual evita las consecuencias patológicas asociadas a la obesidad así como los efectos lipotóxicos asociados. Existen tres factores que influyen directamente sobre la capacidad de expansión del tejido adiposo y su funcionalidad, y que son una diana de estudio para encontrar la explicación a la existencia de sujetos obesos metabólicamente sanos: la capacidad lipogénica del tejido adiposo, la capacidad angiogénica y la capacidad adipogénica por neoformación a partir de las células progenitoras.

A pesar de que se conoce que los adipocitos juegan un papel importante controlando los cambios que ocurren en el tejido adiposo, varias evidencias apuntan a que es la respuesta inflamatoria generada por los macrófagos existentes en el tejido la que desencadena el estado de resistencia a la insulina inducido por la obesidad (Weisberg *et al.*, 2003). Sin embargo, estudios recientes han revelado que los macrófagos no son las únicas células inmunes implicadas en el remodelado del tejido adiposo blanco. Entre ellas se encuentran las células del linaje de linfocitos T (linfocitos CD4⁺, CD8⁺ y T-reguladores) y los mastocitos (Nishimura *et al.*, 2009; Winer *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2009). La hiperplasia e hipertrofia de los adipocitos producen un estado de hipoxia, muerte celular, aumento de la secreción de citoquinas y una desregulación del flujo de ácidos grasos (Sun *et al.*, 2011). Como consecuencia, se crea un ambiente proinflamatorio y de reclutamiento de macrófagos y células inflamatorias que propicia el remodelado tisular. Por lo tanto, los adipocitos son considerados los encargados del reclutamiento de los macrófagos a través de varios mecanismos:

- i. Muerte celular: La muerte de los adipocitos (necrótica o apoptótica) como consecuencia de una hipertrofia excesiva es un potente estímulo fagocítico que regula la infiltración de los macrófagos (Cinti *et al.*, 2005).
- ii. Quimiotaxis: Las quimiocinas son las principales moléculas proinflamatorias que movilizan a los macrófagos desde la médula ósea a los tejidos. Un tejido adiposo obeso presenta una desregulación de estas moléculas, aumentando particularmente la secreción de las de tipo proinflamatorio: *tumor necrosis factor α* (TNF- α), interleuquina-6 y *Monocyte chemoattractant protein-1* (MCP-1, también conocida como quimoquina 2 -CCL2-)(Weisberg *et al.*, 2003).
- iii. Hipoxia: La hipertrofia de los adipocitos al inicio de la expansión del tejido causa que diversas zonas sufran microhipoxia (Kabon *et al.*, 2004). Esto provoca que varias adipoquinas

relacionadas con la inflamación sean sobreexpresadas por esta hipoxia (*macrophage migration inhibitory factor* –MIF–, *matrix metalloproteinases* –MMP2 y MMP9–, interleuquina-6, *Plasminogen activator inhibitor-1* –PAI-1–, *vascular endothelial growth factor* –VEGF–, Leptina), y que se induzca la fibrosis local del tejido adiposo estimulando las repuestas inflamatorias locales (Halberg *et al.*, 2009).

- iv. Flujo de ácidos grasos: El aumento de lípidos extracelulares debido a una tasa elevada de lipólisis por los adipocitos hipertrofiados, o un gran flujo de ácidos grasos saturados en los adipocitos, activa la respuesta inflamatoria clásica a través del complejo *toll like receptor 4* (TLR4), provocando una acumulación de macrófagos (Suganami *et al.*, 2005; Shi *et al.*, 2006).

2.2. TEJIDO ADIPOSO MARRÓN

La principal función descrita hasta el momento para el tejido adiposo marrón o grasa parda es la de generar calor mediante la oxidación de los ácidos grasos (Frontini and Cinti, 2010). Esto es posible gracias a la proteína de la membrana interna mitocondrial *uncoupling protein-1* (UCP-1) que disipa el gradiente electroquímico en forma de calor. El tejido adiposo marrón aparece únicamente en mamíferos y es especialmente abundante en los recién nacidos. En éstos les permite mantener el calor corporal al pasar del vientre de la madre, donde la temperatura es óptima, al exterior, donde la temperatura puede llegar a ser bastante inferior. Con el desarrollo, el tejido adiposo marrón va desapareciendo e incluso se llegó a pensar que desaparecería por completo. Se ha descubierto, sin embargo, que en los adultos se encuentran algunos acúmulos de tejido adiposo marrón muy escasos y dispersos (Virtanen *et al.*, 2009).

Los adipocitos marrones, los cuales representan un 40% de las células del tejido, presentan múltiples gotas lipídicas pequeñas y numerosas mitocondrias circulares de gran tamaño que confieren una cierta tonalidad oscura, que es lo que da el nombre a este tejido. Igual que el tejido adiposo blanco, el tejido adiposo marrón está fuertemente innervado y vascularizado. Sin embargo, la estimulación simpática de la lipólisis estimula la cadena respiratoria para liberar calor en lugar de producir energía en forma de adenosín trifosfato (ATP, del inglés *Adenosine triphosphate*) (Cannon and Nedergaard, 2004).

A pesar de las diferencias descritas entre los adipocitos del tejido adiposo blanco y marrón, ambas células se diferencian a partir de MSC mediante el proceso de adipogénesis (Gesta *et al.*, 2007). Sin embargo, estudios recientes han revelado que los adipocitos del tejido adiposo marrón están más relacionados con los miocitos del músculo esquelético, que también proviene de MSC, que

con los adipocitos del tejido adiposo blanco, y que esta divergencia ocurre durante el desarrollo temprano de los tejidos adiposos (Figura 13) (Seale *et al.*, 2008).

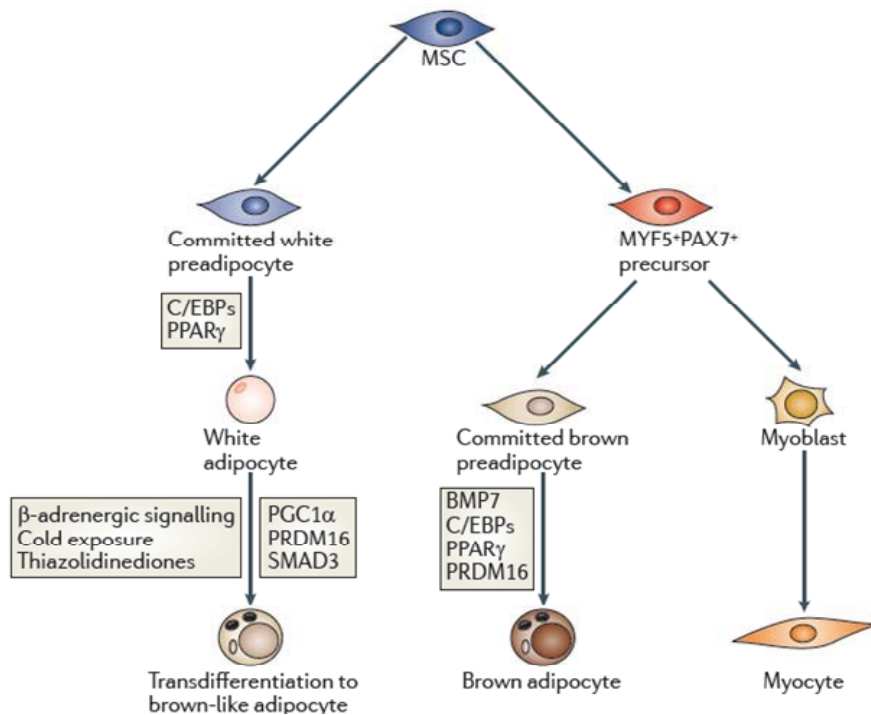


Figura 13. Relación entre los adipocitos blancos, marrones y los miocitos. Contrariamente a lo que se creía, los adipocitos marrones comparten el mismo precursor celular que los miocitos esqueléticos. Sin embargo, existen evidencias indirectas que indican que los adipocitos blancos podrían adquirir características típicas de los adipocitos marrones si son estimulados por señales β -adrenérgicas, exposiciones a bajas temperaturas y con el uso de tiazolidinediona (Himms-Hagen *et al.*, 2000). Figura de Cristancho y col. (Cristancho and Lazar, 2011). BMP7, *Bone morphogenetic protein 7*; C/EBPs, *CCAAT-enhancer-binding proteins*; MSC, del inglés *Mesenchymal Stem Cells*; MYF5, *Myogenic factor 5*; PAX7, *Paired box 7*; PGC1 α , *PPAR γ coactivator 1- α* ; PPAR γ , *Peroxisome proliferator-activated receptor γ* ; PRDM16, *PR domain containing 16*; SMAD3, *SMAD family member 3*.

3. CÉLULAS MADRE DERIVADAS DEL TEJIDO ADIPOSO

Durante muchos años se ha creído que el crecimiento hiperplásico del tejido adiposo se debía a la existencia de una población unipotente de células progenitoras, los preadipocitos. Sin embargo, en 2001 Zuck y col. identificaron la existencia de MSC en el tejido adiposo capaces de diferenciarse, tanto a adipocitos como a otros linajes celulares (Zuk *et al.*, 2001). Utilizando ensayos clonogénicos se ha demostrado la capacidad autorenovadora y de multipotencialidad que tienen estas células *in vitro*. Desde entonces, el tejido adiposo ha sido considerado como una fuente de MSC para su uso en la terapia celular (Zuk *et al.*, 2001).

Se han utilizado una gran variedad de nombres para definir estas células: *adipose-derived adult stem cells* (ADAS), *adipose derived adult stromal cells*, *adipose-derived stromal cells* (ADSC), *adipose stromal cells* (ASC), *adipose mesenchymal stem cells* (AdMSC), *preadipocytes*, *processed lipoaspirate* (PLA) *cells*, y *adipose-derived stromal/stem cells* (ASC). Teniendo en cuenta que la metodología utilizada para aislarlas es la misma (adherencia al plástico), y que probablemente se trate de la misma población celular, en 2004 la *International Fat Applied Technology Society* alcanzó el consenso de adoptar el término de *adipose-derived stromal/stem cells* (ASC) para identificarlas (Gimble *et al.*, 2007).

Hoy en día se utilizan tres tipos de procedimientos quirúrgicos para obtener tejido adiposo y aislar las ASC: extracción quirúrgica, liposucción tumescente y liposucción con ultrasonidos. Varios estudios independientes han comparado si el tipo de procedimiento quirúrgico afecta de alguna manera a las características de las ASC. Determinaron que la liposucción tumescente por sí sola no influía en la viabilidad de las células aisladas, mientras que la liposucción con ultrasonido obtenía un menor número de células y con una menor capacidad de proliferación (Oedayrajsingh-Varma *et al.*, 2006).

3.1. CARACTERÍSTICAS DE LAS ASC

Las ASC presentan las características típicas de las MSC propuestas por el *Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee of the International Society for Cellular Therapy* (Dominici *et al.*, 2006):

- i. Las MSC deben adherirse al material plástico mientras se mantengan en condiciones de cultivo estándar.
- ii. Las MSC deben presentar la habilidad de diferenciarse a los linajes osteogénico, adipogénico y condrogénico.

- iii. Las MSC deben expresar los siguientes marcadores de superficie: CD105, CD73 y CD90; y no expresar: CD45, CD34, CD14 o CD11b, CD79 α o CD19, ni moléculas de superficie HLA-II (*Human leukocyte antigen*).

Inicialmente las MSC más estudiadas fueron las derivadas de la médula ósea (BM-MSC, del inglés *Bone-marrow mesenchymal stem cells*), sin embargo, y a pesar de que las ASC y las BM-MSC presentan un fenotipo y unas características muy similares, las ASC obtuvieron un gran interés debido a la gran cantidad de tejido adiposo blanco que se podía obtener a través de un procedimiento quirúrgico menos invasivo y con una menor morbilidad, obteniendo así un mayor número de células.

Las ASC no presentan un único marcador de superficie que permita identificarlas, sino que expresan los marcadores característicos de las MSC junto con algunos que se expresan en líneas no progenitoras (Tabla 6). Sin embargo, varios grupos han encontrado diferencias en el perfil de marcadores de superficie entre las diferentes poblaciones de MSC (Wagner *et al.*, 2005).

Marcadores presentes en ASC		Marcadores ausentes en ASC	
αSMA	<i>α-Smooth muscle actin (ACTA2)</i>	CD104 *	<i>β4 Integrin</i>
CD10	<i>Neutral Endopeptidase (NEP)</i>	CD106 *	<i>Component of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1)</i>
CD105	<i>Endoglin (SH2)</i>	CD117	<i>c-Kit</i>
CD13	<i>Alanine aminopeptidase</i>	CD11b	<i>αM Integrin</i>
CD146	<i>Melanoma cell adhesion molecule (MCAM)</i>	CD11c	<i>αX Integrin</i>
CD166	<i>Activated leukocyte cell adhesion molecule (ALCAM)</i>	CD133	<i>Prominin 1</i>
CD24	<i>Heat Stable Antigen (HSA)</i>	CD14	
CD29	<i>β1 Integrin</i>	CD144	<i>VE-Cadherin</i>
CD44	<i>Hyaluronic acid / fibronectin receptor</i>	CD15	<i>Stage specific embryonic antigen 1(SSEA-1)</i>
CD49d *	<i>α4 Integrin</i>	CD16	<i>Fc receptor for IgG</i>
CD49e	<i>α5 Integrin</i>	CD19	<i>B-lymphocyte surface antigen B4</i>
CD54 *	<i>Intracellular adhesion molecule-1 (ICAM-1)</i>	CD3	<i>T cell Receptor (TCR)</i>
CD55	<i>Complement Decay-Accelerating Factor (DAF)</i>	CD31	<i>Platelet endothelial cell adhesion molecule 1(PECAM-1)</i>
CD58		CD33	
CD59	<i>Membrane attack complex inhibition factor (MACIF)</i>	CD34 #	
CD71	<i>Transferrin Receptor</i>	CD38	
CD73	<i>Ecto-5'-nucleotidase (SH3)</i>	CD4	<i>MHC-II coReceptor</i>
CD9		CD45	<i>Leukocyte common antigen (LCA)</i>
CD90	<i>Thymus cell antigen-1 (Thy-1)</i>	CD56	<i>Neural cell adhesion molecule (NCAM)</i>
HLA-I	<i>Human leukocyte antigen class I (A, B, C)</i>	CD61	<i>β3 Integrin</i>
Sca-1	<i>Stem Cell Antigen 1, ly-6A/E</i>	CD62E	<i>E-selectin</i>
		CD62P	<i>P-selectin</i>
		CD79a	<i>Immunoglobulin-associated α</i>
		CD80	<i>B7.1</i>
		gly-A	<i>Glycophorin A</i>
		HLA-DR	<i>Human leukocyte antigen class II (DR, DP, DQ)</i>
		Lin [†]	<i>Lineage antigen</i>
		MyD88	<i>Myeloid differentiation primary response-88</i>
		Stro-1 *	<i>Stromal cell antigen-1 (a niveles bajos)</i>
		VEGFR2	<i>Vascular endothelial growth factor receptor 2 (Flk-1, KDR)</i>

Tabla 6. Marcadores de superficie característicos de las ASC (Badimon *et al.*, 2013; Cawthorn *et al.*, 2012). ASC, del inglés *Adipose-derived stromal/stem cells*; BM-MSC, del inglés *Bone-marrow mesenchymal stem cells*. * Marcador que se expresa de manera opuesta entre ASC y BM-MSC. # Marcador que presenta controversias en la expresión en las ASC, algunos autores lo detectan mientras otros no. [†] *Lin antigens* consiste en el siguiente conjunto de marcadores de linaje: CD2, CD3, CD4, CD5, CD8, NK1.1, B220, Ter-119, y Gr-1 (*Granulocyte differentiation antigen 1*).

Las ASC se caracterizan por presentar una forma fibroblástica, adherirse al plástico, expandirse fácilmente al ser cultivadas *in vitro* y ser capaces de diferenciarse a otras líneas celulares. Se ha descrito que *in vitro*, las ASC no sólo se diferencian a células de linaje mesenquimal (*trans-differentiation*), como serían los adipocitos, condrocitos, osteocitos, miocitos del músculo esquelético, y adipocitos marrón; sino que también se diferencian a células de otro linaje (*cross-differentiaion*), como células del sistema nervioso, células β -pancreáticas, células endoteliales, hepatocitos, cardiomiocitos, y miocitos del músculo liso (Cawthorn *et al.*, 2012). En general, estos análisis de multipotencialidad se basan en cambios morfológicos y en la expresión de marcadores característicos para cada tipo celular (Figura 14). En algunos casos, la diferenciación terminal se analiza funcionalmente, como sería el caso de la contractibilidad de los miocitos (Rangappa *et al.*, 2003; Rodriguez *et al.*, 2006), o la producción de mielina en las células de Schwann (Xu *et al.*, 2008).

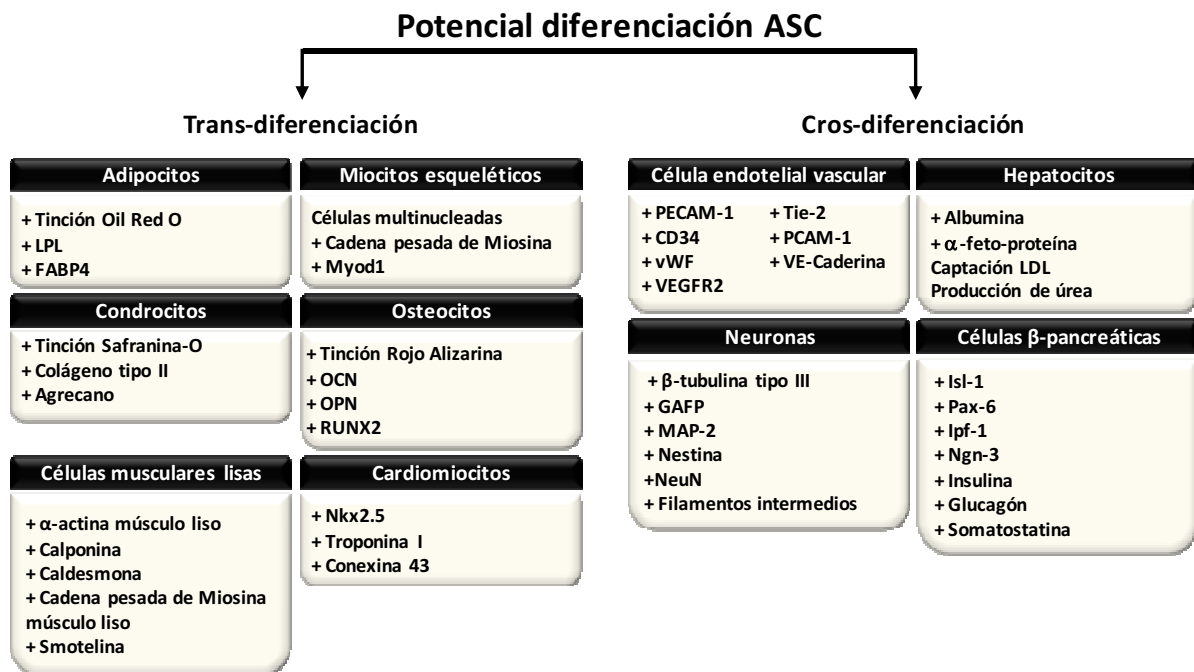


Figura 14. Potencial de diferenciación de las ASC. Las ASC tienen la capacidad de diferenciarse a otros tipos celulares de su mismo linaje mesodérmico (trans-diferenciación), o de otro linaje (cros-diferenciación) (Schaffler and Buchler, 2007). ASC, del inglés *Adipose-derived stromal/stem cells*; FABP4, *Fatty Acid Binding Protein 4*; GAFF, *glial acidic fibrillar protein*; Ipf-1, *insulin promoter factor 1*; Isl-1, *Insulin gene enhancer protein*; LDL, del inglés *Low-density lipoprotein*; LPL, *Lipoprotein lipase*; MAP-2, *Microtubule-associated protein 2*; Myod1, *Myogenic differentiation 1*; NeuN, *Neuronal Nuclei*; Ngn-3, *neurogenin 3*; Nkx2.5, *NK2 homeobox 5*; OCN, *Osteocalcin*; OPN, *Osteopontin*; Pax-6, *Paired box protein 6*; PECAM-1, *Platelet endothelial cell adhesion molecule 1*; RUNX2, *Runt-related transcription factor 2*; Tie-2, *TEK tyrosine kinase endothelial o Angiopoietin receptor*; VEGFR2, *Vascular endothelial growth factor receptor 2*; vWF, *Von Willebrand factor*.

Las ASC juegan un papel muy importante en la revascularización de los tejidos dañados, la inhibición de la apoptosis y en la inmunomodulación debido a que son células metabólicamente activas. Se ha descrito que las ASC secretan una gran cantidad de factores de la matriz extracelular así como un gran número de citoquinas, factores de crecimiento, angiogénicos y antiapoptóticos

como el VEGF, *Epidermal growth factor* (EGF), *Hepatocyte growth factor* (HGF), *Insuline-like growth factor 1* (IGF-1), *Platelet-derived growth factor* (PDGF), *Transforming growth factor- β* (TGF β), *Granulocyte/macrophage growth factor* (GM-CSF), MCP-1, *Stromal derive factor-1* (SDF-1 o CXCL12), *Brain-derived neurotrophic factor* (BDNF), *basic Fibroblast growth factor* (bFGF), *Keratinocyte growth factor* (KGF), *Angiopoietin-1* (Ang-1), *Tumor necrosis factor- α* (TNF- α) y un gran número de interlequinas. (Salgado *et al.*, 2010). De hecho, se cree que una gran parte de los efectos beneficiosos que tiene la terapia celular con ASC se debe a la gran secreción de factores que actúan de forma paracrina. Probablemente, el HGF sea el factor angiogénico más importante secretado por las ASC ya que tiene una gran importancia en los efectos paracrinos producidos por las ASC (Cai *et al.*, 2007). Es importante recalcar que los factores angiogénicos y anti-apoptóticos son secretados en niveles bioactivos, y que esta secreción se ve incrementada en condiciones de hipoxia (Rehman *et al.*, 2004).

3.2. ORIGEN DE LAS ASC

Parece ser que la generación de nuevos adipocitos es un fenómeno permanente tanto en animales como en humanos, aproximadamente un 10% de los adipocitos son renovados cada año en humanos (Spalding *et al.*, 2008). Sin embargo, se desconoce de dónde provienen los precursores adipocíticos, por cuánto tiempo y bajo qué circunstancias pueden generar adipocitos o incluso participar en otras funciones del organismo.

Varios estudios han intentado identificar la localización de las ASC dentro del tejido adiposo. Sin embargo, ha sido complicado debido a que no existe un marcador único y específico que las identifique. Diversos estudios histológicos indican que las poblaciones de MSC, incluidas las ASC, residen en la zona perivascular del tejido (Tang *et al.*, 2008; Gupta *et al.*, 2012). De esta manera, ya que se ha observado que los adipocitos se desarrollan al mismo tiempo que la vasculatura, las ASC podrían dar lugar tanto a los adipocitos como a los pericitos, células endoteliales y células de la musculatura lisa. Por lo tanto, parece que la vasculatura del tejido adiposo funcionaría como un nicho de progenitores celulares, liberando señales estimuladoras de diferenciación. De ahí que se plantee la posibilidad de que estos precursores pudieran provenir de fuera del tejido adiposo (Crossno *et al.*, 2006).

Desde que se definió que los adipocitos y sus progenitores derivaban de MSC (Gesta *et al.*, 2007), se ha sugerido que las ASC podrían proceder de células de linaje mesenquimal de la médula ósea. De hecho, las células del SVF presentan varias similitudes con las de la médula ósea. Ambos estromas contienen una población heterogénea de células mesenquimales con capacidad de diferenciación a varios linajes (adipocítico, condrocítico y miogénico) en función de las condiciones de cultivo (De

Ugarte *et al.*, 2003). De hecho, Mansilla y col. sugieren que la médula ósea es el órgano central productor de MSC que abastece a las poblaciones de MSC que se encuentran en el resto de órganos (Figura 15).

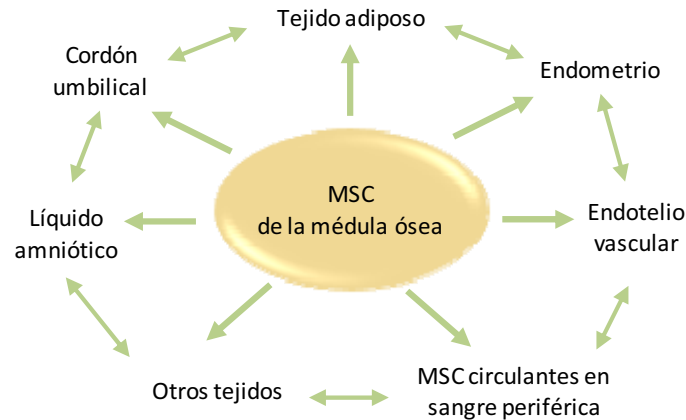


Figura 15. Reservorios de MSC. Las diferentes poblaciones de MSC se encuentran distribuidas por todo el organismo y coordinadas entre sí. La población de la médula ósea sería la población central, mientras que el resto de tejidos serían los reservorios periféricos. Normalmente, las células se mantienen en estado quiescente e indiferenciado, hasta que son “llamadas” a proliferar y movilizarse a los tejidos requeridos. Figura adaptada de Mansilla y col. (Mansilla *et al.*, 2011). MSC, del inglés *Mesenchymal stem cells*.

A pesar de que en individuos sanos es prácticamente inexistente la presencia de MSC en circulación, éstas son movilizadas hacia zonas que han sido dañadas donde participan en la reparación y la regeneración del tejido (Kolonin *et al.*, 2012). Teniendo en cuenta que las MSC son probablemente las células especializadas en reparación más importantes (Kode *et al.*, 2009), sería posible pensar que el tejido adiposo blanco obeso, al ser una fuente importante de factores quimioatrayentes, fuera un nicho donde las MSC circulantes podrían anidar y diferenciarse a adipocitos (Mansilla *et al.*, 2011).

3.3. ASC EN LOS DIFERENTES TEJIDOS ADIPOSOS BLANCOS

Se ha sugerido que la diferencia metabólica que se observa entre los tejidos adiposo subcutáneo y tejido adiposo visceral se debe a las características intrínsecas que presentan las células residentes en cada tejido, incluidas las ASC. De hecho, se ha observado que adipocitos diferenciados *in vitro* a partir de ASC derivadas de los tejidos adiposo subcutáneo y tejido adiposo visceral presentan diferencias inherentes de ambos tejidos (Perrini *et al.*, 2008), y que estas diferencias son estables y se mantienen incluso después de que las ASC se hayan aislado y cultivado *in vitro* (Tchkonina *et al.*, 2006). Varios estudios han descrito que las ASC de diferentes tejidos adiposos presentan diferencias

en su potencial de proliferación, de diferenciación y apoptosis, así como en el patrón de expresión genético (Van Harmelen *et al.*, 2004; Tchkonja *et al.*, 2007; Gesta *et al.*, 2006).

Tchkonja y col. compararon ASC humanas de tejido adiposo subcutáneo, y de los tejidos adiposos visceral, mesentérico y omental, y observaron que la expresión de genes implicados en el desarrollo temprano variaba entre las diferentes ASC (Tchkonja *et al.*, 2007). De hecho, las ASC del tejido adiposo mesentérico y subcutáneo presentaban un perfil de expresión más parecido entre sí que con las del tejido adiposo omental. Van Harmelen y col. describieron que las ASC del tejido adiposo subcutáneo proliferaban más que las derivadas del tejido adiposo visceral (Van Harmelen *et al.*, 2004). Además, encontraron que la edad sólo afectaba a la proliferación de las ASC subcutáneas y no a las del tejido adiposo visceral. Estos resultados sugerían que el efecto de la edad sobre las ASC dependía del tipo de tejido, pudiendo explicar así tanto el crecimiento de tejido adiposo visceral como la pérdida de tejido adiposo subcutáneo que se observan con la edad (Sepe *et al.*, 2011).

Del mismo modo, se ha descrito que las ASC del tejido adiposo subcutáneo presentan una mayor capacidad de diferenciación adipogénica que las ASC del tejido adiposo visceral (omental). Esta baja capacidad de diferenciación por parte de las ASC omentales podría en parte explicar que la grasa se acumulara en los adipocitos ya existente y, como consecuencia, el tamaño de sus vacuolas lipídicas incrementara. En cambio, la mayor capacidad de diferenciación de las ASC subcutáneas resultaría en un acúmulo lipídico en adipocitos nuevos y con vacuolas más pequeñas (Majka *et al.*, 2011). De hecho, el tamaño de las vacuolas lipídicas de los adipocitos viscerales correlacionan con los niveles lipídicos circulantes, mientras que el nivel de hiperplasia y el tamaño de los adipocitos subcutáneos están más relacionados con los niveles plasmáticos de glucosa e insulina, y la sensibilidad a la insulina (Hoffstedt *et al.*, 2010).

Sin embargo, hoy en día aún se desconoce cómo y en qué momento del desarrollo las ASC de los diferentes tejidos adiposos adquieren el fenotipo característico de cada tejido. Podría ser que las características regionales de las diferentes ASC fueran reguladas epigenéticamente, apareciendo durante etapas tempranas del desarrollo y estableciéndose posteriormente por el ambiente de cada tejido adiposo, y de cada individuo. El conocimiento de las diferencias de las ASC de los diferentes tejidos adiposos sería de gran interés para una mejor comprensión de la biología del tejido y el desarrollo de sus diferentes depósitos.

3.4. AFECTACIÓN DE LAS ASC POR SITUACIONES PATOFISIOLÓGICAS

Estudios recientes sugieren que una alteración de la homeostasis de las células madre debido a un constante y repetido estímulo nocivo puede provocar un desequilibrio persistente en el reservorio

de éstas células desencadenando una disminución prematura e irreversible de su potencial regenerativo.

Diversos estudios han demostrado como la presencia de hipercolesterolemia, diabetes de tipo 1/2, hipertensión, diferentes grados de riesgo cardiovascular o el tabaco afectan de forma negativa a las células progenitoras endoteliales (EPC, del inglés *Endothelial progenitor cells*) circulantes. Estos individuos presentan un menor número de células con una senescencia más avanzada y una menor supervivencia (Hill *et al.*, 2003; Hamed *et al.*, 2010). Además, estas células tienen disminuida su capacidad angiogénica y de migración celular (Fadini *et al.*, 2006b; Fadini *et al.*, 2006a; Chen *et al.*, 2004; Tepper *et al.*, 2002). Por otro lado, también se ha descrito que los individuos con diabetes tienen afectadas las BM-MSC, presentando una mayor expresión de marcadores de senescencia y apoptosis y una disminución de marcadores de supervivencia (Khan *et al.*, 2011).

La edad es otro claro ejemplo de deterioro de órganos y tejidos, y que provoca una deficiencia en las células madre del organismo. Se ha descrito que en individuos mayores el número de EPC circulantes está reducido, presentando un fenotipo proapoptótico, una mayor senescencia y una menor funcionalidad (Hoetzer *et al.*, 2007; Heiss *et al.*, 2005). Las BM-MSC tienen disminuido su potencial de proliferación y de diferenciación en individuos con edad avanzada (Stolzing *et al.*, 2008; Zaim *et al.*, 2012). Y del mismo modo, se ha descrito que las ASC también se ven afectadas por la edad disminuyendo su capacidad de proliferación así como su potencial angiogénico y de diferenciación (Madonna *et al.*, 2011; Zhu *et al.*, 2009; Efimenko *et al.*, 2011). De hecho, los preadipocitos de individuos mayores adquieren un fenotipo de “célula parcialmente diferenciada a adipocito” (MAD, del inglés *Mesenchymal adipocyte-like default cells*), y no son capaces de diferenciarse a células adipocíticas maduras y funcionales (Kirkland *et al.*, 2002).

La obesidad también ha sido descrita como una enfermedad que afecta a la población de EPC circulantes así como a las BM-MSC y las ASC. Los individuos obesos presentan un menor número de EPC y con una menor capacidad clonogénica comparado con individuos delgados (Muller-Ehmsen *et al.*, 2008; MacEaney *et al.*, 2009). Asimismo, la respuesta osteogénica de las BM-MSC se ve afectada en individuos con un BMI elevado (Friedl *et al.*, 2009). Van Harmelen y col. observaron que la capacidad de diferenciación adipogénica de las ASC del tejido adiposo subcutáneo mamario disminuía en mujeres con un BMI elevado (van Harmelen *et al.*, 2003). Posteriormente, Nair y col. identificaron que las ASC de tejido adiposo subcutáneo de individuos Indios Pima obesos presentaban una mayor expresión de genes proinflamatorios comparado con los individuos delgados (Nair *et al.*, 2005). Sin embargo, el estudio de cómo las ASC se ven afectas por la obesidad está empezando a estudiarse y hay poca información al respecto.

3.5. ASC EN LA TERAPIA CELULAR

Idealmente, las células madre que se usan para la terapia celular suelen presentar las siguientes características:

- i. Se han de encontrar de forma abundante (de millones a billones de células).
- ii. Se han de obtener mediante un procedimiento mínimamente invasivo.
- iii. Se han de poder diferenciar a diversos linajes celulares de manera controlada y reproducible.
- iv. Se han de poder trasplantar de forma segura y eficaz de forma autóloga y alogénica.
- v. Se han de poder preparar siguiendo los estándares de control y calidad de las guías de Buenas Prácticas de Preparación.

Durante muchos años se han utilizado las BM-MSC como fuente principal de células madre para medicina regenerativa, y como alternativa al uso de las células madre embrionarias (Smart and Riley, 2008). Sin embargo, estudios recientes han demostrado que las ASC presentan una gran ventaja debido a su fácil obtención y aislamiento, y la gran cantidad obtenida (Gimble *et al.*, 2012; Mizuno *et al.*, 2012).

Se han propuesto varios mecanismos por los cuales las ASC llevarían a cabo su capacidad regenerativa. Inicialmente se sugirió que era mediante la diferenciación a otras líneas celulares reemplazando así a las células dañadas, aunque varios estudios en animales no aprueban este modelo (Rehman *et al.*, 2004; Miranville *et al.*, 2004; Puissant *et al.*, 2005). En segundo lugar se sugirió que era a través de los factores paracrinos liberados por las ASC, factores de crecimiento, pro-angiogénicos y anti-inflamatorios, los que actuaban acelerando el proceso de reparación, siendo este último el más corroborado (Mizuno *et al.*, 2012; Gimble *et al.*, 2012).

Se han llevado a cabo varios estudios preclínicos y algunos clínicos en diversos ámbitos de la medicina regenerativa: neuronal, adipogénica, musculo esquelética, hematopoyética, hepática, cardiovascular, trastornos inmunológicos, cirugía plástica y terapia génica. En la Tabla 7 se muestra un resumen del número de ensayos clínicos que se han hecho o se están llevando a cabo utilizando ASC (según clinicaltrials.gov).

Enfermedad	Nº de estudios	Enfermedad	Nº de estudios
Enfermedad metabólica		Enfermedad del Sistema Nervioso	
Lipodistrofia	2	Ataxia	1
Diabetes	5	Hemiatrofia facial	1
Enfermedad Cardiovascular		Esclerosis múltiple	2
Enfermedad vascular	2	Parkinson	1
Cardiopatía isquémica	11	Lesiones de la médula espinal	3
Ictus	2	Daño cerebral	2
Trastornos Músculo-esqueléticos		Trastornos Mentales	1
Tendón	1	Enfermedades del Sistema Digestivo	
Artritis	6	Trastornos intestinales	2
Enfermedad degenerativa discal	1	Cirrosis hepática	1
Necrosis	1	Fibrosis	11
Trastornos Renales y Urológicos	1	Enfermedades Mamarias	4
Incontinencia urinaria	4	Enfermedad de injerto contra huésped	7
Insuficiencia renal	1	Enfermedad de Crohn	2
Trastornos de la uretra	1	Injerto de Grasa Autóloga	3
Enfermedades del Sistema Endocrino	1	Síndrome de Fragilidad	1
Trastornos Respiratorios	2		

Tabla 7. Ensayos clínicos realizados con ASC (clinicaltrials.gov). Los datos están actualizados hasta julio del 2013.

3.5.1. APLICACIONES TERAPÉUTICAS

▪ Tejidos blandos:

Actualmente se están utilizando diversos materiales para la regeneración de los tejidos blandos como el colágeno, el ácido hialurónico y el silícico, entre otros. Sin embargo, éstos presentan varios inconvenientes como un alto coste, la posibilidad de desencadenar respuestas alérgicas o de transmitir enfermedades infecciosas. Una alternativa muy eficaz ha sido el uso de injertos de tejido adiposo autólogo, desde que en 1983 se utilizaran por primera vez para llevar a cabo una reconstrucción mamaria (Locke and de Chalain, 2008). No obstante, con el tiempo estos injertos se van reabsorbiendo llegando a disminuir del 20-90% su volumen inicial, posiblemente debido a la poca revascularización del injerto y por consiguiente la muerte de los adipocitos (Cherubino and Marra, 2009).

El descubrimiento de las ASC ha despertado un gran interés en la regeneración de los tejidos blandos ya que, lógica y teóricamente, parece ser la aplicación más simple de estas células para la terapia celular debido a que no tendrían que diferenciarse a otro tipo celular.

Recientemente se han llevado a cabo varios estudios en los que se han utilizado ASC para regenerar lesiones cutáneas crónicas en pacientes diabéticos, inmunodeprimidos o que han sufrido tratamientos de radiación, así como en cicatrices profundas. Se ha observado que las ASC permanecen viables en el lugar de la herida secretando de forma continua, regulada y en respuesta a las señales del ambiente factores de crecimiento implicados en la cicatrización de las heridas y en el aumento de la vascularización.

En modelos murinos diabéticos se ha observado una aceleración en la cicatrización de úlceras diabéticas (Nambu *et al.*, 2009). Dos ensayos clínicos han utilizado ASC humanas para tratar los daños tisulares producidos por radiación observando un aumento en la hidratación tisular así como la formación de nuevos vasos (Rigotti *et al.*, 2007; Akita *et al.*, 2010). Además, se ha llevado a cabo otro ensayo clínico en el que se han tratado cicatrices profundas con ASC y, tras 1 año, se ha asegurado la seguridad y eficacia del tratamiento (Kim *et al.*, 2011b).

Sin embargo, mientras varios estudios sostienen que los efectos paracrinos de las ASC son beneficiosos para el tratamiento de las lesiones cutáneas, se ha visto que la liberación de las mismas citoquinas podría tener un efecto perjudicial en presencia de células tumorales. Estudios *in vitro* e *in vivo* en cánceres de mama, próstata y en el sarcoma de Kaposi han mostrado que las citoquinas secretadas por las ASC podrían promover el reclutamiento y la proliferación de las células cancerígenas (Zhang *et al.*, 2009). Es por ello que el uso de estas células para la reconstrucción mamaria post-mastectomía continúa siendo controvertido y no probada su eficacia (Pearl *et al.*, 2012).

- **Tejidos músculo-esqueléticos:**

La reparación ósea usando ASC ha sido un gran objetivo para los investigadores desde que se describió que durante el desarrollo existe una gran relación entre la adipogénesis y la osteogénesis. Se han publicado resultados prometedores en la reparación de los tejidos esqueléticos en modelos animales (Lee *et al.*, 2011; Levi *et al.*, 2010), trasladando estos hallazgos a la práctica clínica. Se han inyectado ASC junto con injertos (*scaffold*) óseos autólogos o de fosfato tricálcico, y proteína morfogenética ósea-2, para reconstruir defectos craneales producidos por traumatismos (Lendeckel *et al.*, 2004; Thesleff *et al.*, 2011) o maxilares (Mesimaki *et al.*, 2009). En ambos casos se obtuvieron resultados beneficiosos.

Otros estudios han analizado la capacidad de las ASC de recuperar la función de un músculo atrofiado. Se ha observado una recuperación de la función muscular de un modelo murino de distrofia muscular al inyectar ASC alogénica (Rodríguez *et al.*, 2005b), y una regeneración del tejido muscular en modelos murino (Kim *et al.*, 2006b). Aunque no se conoce si las ASC se diferencian o se fusionan con otras fibras musculares, parece ser que son capaces de desarrollar ambas funciones (Di Rocco *et al.*, 2006).

La regeneración del tendón y del tejido periodontal es otra aplicación en este campo. Algunos estudios en animales han observado que la implantación de ASC promueve la regeneración del tejido periodontal (Tobita *et al.*, 2008) y acelera la reparación del tendón aumentando su fuerza de tensión (Uysal and Mizuno, 2011).

- **Lesiones isquémicas:**

En los últimos años se han llevado a cabo un gran número de estudios preclínicos y algunos clínicos que analizan el uso, el comportamiento y el efecto de las ASC en el tratamiento de lesiones isquémicas, con principal interés en la regeneración del miocardio isquémico (Mazo *et al.*, 2011). Se han utilizado diversidad de modelos animales para el tratamiento de los infartos de miocardio como roedores, conejos, monos y cerdos, el modelo más parecido al humano (Bel *et al.*, 2010). En estos estudios se ha observado, *in vivo*, la capacidad de las ASC para diferenciarse a varios tipos celulares del miocardio así como secretar un gran número de factores pro-angiogénicos y anti-apoptóticos. Como resultado, estos estudios han observado un aumento de la función ventricular y una disminución del tamaño de la zona infartada disminuyendo la posibilidad de desarrollar arritmias fatales. Actualmente los ensayos clínicos que se están llevando en esta área están en fase I-II.

Aunque en menor grado, también se ha investigado el uso de las ASC en modelos de isquemia periférica e ictus. En los estudios de isquemia periférica, las mejoras observadas se atribuyen a la secreción de factores proangiogénicos por parte de las ASC (Nakagami *et al.*, 2005). De hecho, ya se ha llevado a cabo un estudio piloto en pacientes con isquemia periférica crítica, observando una mejoría en el 66,7% de los pacientes (Lee *et al.*, 2012). Por otro lado, en el estudio de la isquemia cerebral, los investigadores observaron una mejora neurológica y una disminución de la zona infartada al inyectar ASC inducidas hacia la diferenciación neuronal (Yang *et al.*, 2011).

- **Trastornos inmunológicos:**

Debido a que las ASC presentan funciones inmunomoduladoras, se están llevando a cabo una gran investigación preclínica y clínica para su aplicación en el tratamiento de enfermedades inmunológicas.

En modelos animales de lupus eritematoso sistémico, artritis, colitis y de la enfermedad de injerto contra huésped, el tratamiento con ASC ha provocado un aumento de la supervivencia de los animales así como una disminución de los anticuerpos antinucleares, de los procesos inflamatorios y de la pérdida de peso (Yanez *et al.*, 2006; Choi *et al.*, 2012; Gonzalez *et al.*, 2009; Gonzalez-Rey *et al.*, 2009). Del mismo modo, se ha observado una disminución de la pérdida axonal y un aumento de las citoquinas antiinflamatorias en el modelo murino de encefalomiелitis autoinmune (Constantin *et al.*, 2009), homólogo a la esclerosis múltiple humana, y por ello se están empezando a realizar ensayos clínicos en pacientes.

Otras enfermedades en las que se están llevando a cabo ensayos en pacientes son la enfermedad de Crohn y la diabetes insulino-dependiente. En los ensayos mencionados anteriormente, las ASC se

inyectaban sistémicamente mientras que en la enfermedad de Crohn y en la diabetes insulino-dependiente las ASC se inyectan localmente. El equipo del Dr. García-Olmo de la Universidad Autónoma de Madrid ha estudiado la aplicación autóloga de las ASC para el tratamiento de las fístulas de pacientes con enfermedad de Crohn, llevando a cabo ensayos clínicos de fase I-II (García-Olmo *et al.*, 2009a; García-Olmo *et al.*, 2005). Además, compararon el uso de ASC y el SVF observando que usando las ASC se obtenía una reparación del 75% de las fístulas crónicas, mientras que usando el SVF sólo obtuvieron el 25% de reparación (García-Olmo *et al.*, 2009b). Los investigadores propusieron que la diferencia entre los resultados podría ser debido a la capacidad antiinflamatoria e inmunosupresora que presentan las ASC al contrario del SVF que no solo no las posee, sino que estimula la proliferación de las células T (McIntosh *et al.*, 2006).

Para mejorar la producción de insulina en pacientes diabéticos insulino-dependientes, se han llevado a cabo varios estudios en animales en los que les co-implantaban ASC junto injertos de páncreas (Fumimoto *et al.*, 2009), o ASC productoras de insulina (Chandra *et al.*, 2009). En el primero, se observó un aumento de la vascularización de la zona y una disminución de la infiltración de células inmunológicas (Ohmura *et al.*, 2010; Fumimoto *et al.*, 2009). Mientras que con las ASC productoras de insulina, los animales restablecieron sus niveles glucémicos y aumentaron los niveles plasmáticos de péptido-c (Chandra *et al.*, 2009; Chandra *et al.*, 2011). Del mismo modo, se ha llevado a cabo un ensayo clínico en la India donde han utilizado ASC productoras de insulina observando una disminución del porcentaje de hemoglobina glicosilada, de la necesidad de insulina exógena, así como un aumento de la producción endógena de insulina (Vanikar *et al.*, 2010).

▪ **Terapia génica:**

Otro uso terapéutico de las ASC es el de utilizarlas como vehículo celular para la terapia génica, ya que utilizar células autólogas para la introducción de material genético es una estrategia muy atractiva, y han demostrado una fácil capacidad de ser transducidas con vectores virales para introducir genes terapéuticos (Morizono *et al.*, 2003).

Se han trasplantado ASC humanas transducidas con el gen de la proteína α 1-antitripsina en el hígado para mantener su expresión a largo plazo en animales con deficiencia de α 1-antitripsina (Li *et al.*, 2011), o que expresan el anticuerpo quimérico CTLA4-Ig (*Cytotoxic T-Lymphocyte antigen 4* fusionado con anticuerpos) en ratones con enfermedad tiroidea autoinmune para inhibir la activación de los linfocitos T (Choi *et al.*, 2011).

Recientemente se han utilizado ASC modificadas para suministrar fármacos anticancerígenos directamente en el tumor, ya que se ha descrito que las ASC inyectadas de manera intravenosa son atraídas hacia zonas tumorales (Zhang *et al.*, 2009; Muehlberg *et al.*, 2009; Walter *et al.*, 2009).

Varios estudios preclínicos han usado este tipo de tratamiento anticancerígeno observando una inhibición del crecimiento tumoral sin afectar, aparentemente, al resto de los tejidos (Kucerova *et al.*, 2007; Grisendi *et al.*, 2010; Ciavarella *et al.*, 2012). Sin embargo, hay que tener en cuenta que aunque las perspectivas de este tipo de terapia sean prometedoras, las cuestiones de seguridad/eficacia son aún dudosas y ciertos aspectos administrativos están todavía muy poco reglamentados.

Debido a que las ASC están siendo una gran alternativa para la terapia celular en varios campos de la medicina, es necesaria una gran comprensión de los mecanismos por los que las células llevarían a cabo la regeneración tisular. Existen varios puntos que se deberían tener en cuenta ya que pueden modificar la funcionalidad de las células, como el lugar anatómico del que se aíslan, el género y la edad del donante. Igualmente, se desconocen los factores moleculares claves que promueven la diferenciación de las ASC a los diferentes linajes. Sin embargo, y a pesar de estas limitaciones, las ASC solo presentan ventajas para su uso en la clínica. Es importante considerar también la posibilidad de usar tanto ASC autólogas como alogénas, ya que varios estudios independientes han determinado que las ASC no promueven la activación del sistema inmunitario de manera alogénica (Kode *et al.*, 2009; Puissant *et al.*, 2005). Si es así, este tipo de transplante tendría un profundo impacto ya que disminuiría el coste de las terapias celulares.

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La obesidad es una disfunción metabólica crónica y compleja que se caracteriza por una acumulación excesiva del tejido adiposo. Igualmente, la obesidad es un factor de riesgo para la diabetes, cáncer y las enfermedades cardiovasculares, entre otras. En la obesidad, el tejido adiposo se encuentra bajo un constante estrés metabólico que desencadena un estado protrombótico y proinflamatorio crónico que promueve la hipertrofia del tejido adiposo.

El tejido adiposo es reconocido como un órgano multifuncional ya que, además de su función energética, también actúa como órgano endocrino y como reservorio de células madre mesenquimales. A pesar de que se conoce que los adipocitos juegan un papel muy importante controlando los cambios del tejido adiposo, actualmente se ha descrito que tanto las células del sistema inmune como las células madre (ASC) están implicadas en el remodelado del tejido adiposo blanco.

El uso de las células madre como terapia celular es considerado como una de las terapias más novedosas. A pesar de que en los últimos años se han utilizado diversos tipos de células madre, de entre todos ellos, las ASC son las células que han adquirido un mayor interés debido a su fácil obtención y su gran potencial terapéutico. No obstante, aún se desconocen los mecanismos por los cuales las ASC podrían llevar a cabo su capacidad reparadora. Las ASC juegan un papel importante en la revascularización de los tejidos dañados, en la inhibición de la apoptosis y en la inmunomodulación. Inicialmente se propuso que la capacidad regenerativa de las ASC se debía a la capacidad que tenían de diferenciarse a otras líneas celulares. Sin embargo, parece ser que son los factores paracrinos liberados por las ASC los que juegan un papel importante en su función reparadora.

Estudios recientes sugieren que una alteración de la homeostasis de las células madre, debido a un constante y repetido estímulo nocivo, podría provocar un desequilibrio persistente en el reservorio de estas células desencadenando una disminución prematura e irreversible de su potencial regenerativo. Diversos estudios han demostrado que la presencia de hipercolesterolemia, diabetes de tipo 1/2, hipertensión, el tabaco y la edad afectan de forma negativa a las células progenitoras circulantes, y a las células mesenquimales de la médula ósea.

Teniendo en cuenta todo esto, la **hipótesis** de este trabajo de tesis se basa en que la obesidad, así como la acumulación de diversos factores de riesgo cardiovascular, alteran el potencial regenerador de las ASC disminuyendo sus capacidades proliferativas, multipotenciales y angiogénicas, y modificando su perfil de expresión génica induciéndolas a un fenotipo menos indiferenciado.

Para llevar a cabo esta hipótesis, se plantearon diversos **objetivos**:

Objetivo 1: Estudiar la dinámica de proliferación de las células madre residentes en el tejido adiposo y su afectación por las condiciones de oxígeno.

Objetivo 2: Estudiar si los pacientes con obesidad mórbida presentan un mayor número de ASC en el tejido adiposo subcutáneo y si expresan los marcadores de superficie característicos de las ASC.

Objetivo 3: Analizar si las propiedades características de las ASC se ven afectadas por la obesidad: la capacidad proliferativa, de diferenciación y angiogénica.

Objetivo 4: Estudiar el transcriptoma de las ASC de pacientes con obesidad mórbida.

Objetivo 5: Estudiar el efecto de la acumulación de diversos factores de riesgo cardiovascular sobre el transcriptoma de las ASC.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. GRUPOS DE PACIENTES

En este estudio se ha trabajado con dos grupos de pacientes agrupados según su BMI: un grupo de pacientes obesos que presentaban obesidad mórbida ($BMI > 40\text{kg/m}^2$), y un grupo de pacientes no-obesos o normopeso ($BMI < 25\text{kg/m}^2$). Ambos grupos de pacientes fueron sometidos a intervenciones quirúrgicas en las que obtuvimos las muestras utilizadas, todas ellas obtenidas con consentimiento informado por parte de los pacientes.

Los pacientes obesos fueron sometidos a cirugía bariátrica de bypass gástrico en Y de Roux por laparoscopia. En cambio, los pacientes no-obesos fueron sometidos a diferentes intervenciones quirúrgicas: lipectomía abdominal, colecistectomía, hernia de hiato o apendicectomía. Los pacientes seguían la medicación acorde con su historial médico. El protocolo del estudio fue previamente aprobado por el Comité Ético del Centro Médico Teknon en concordancia a los principios de la Declaración de Helsinki.

El grupo de pacientes obesos no sólo se caracterizaba por presentar un grado de obesidad determinado, sino que muchos de ellos presentaban otros factores de riesgo cardiovascular como la hipertensión, diabetes tipo 2, dislipemia, algunos eran fumadores, y otros habían sufrido un evento cardiovascular previo. Es por ello que dividimos a los pacientes obesos en 3 grupos en función del número de factores de riesgo que presentaban:

- 1) pacientes que sólo presentaban obesidad
- 2) pacientes obesos + 1 factor de riesgo adicional
- 3) pacientes obesos + 2 o más factores de riesgo adicionales (pacientes con síndrome metabólico)

2. OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS

Durante las cirugías se obtuvieron muestras de sangre y de tejido adiposo.

▪ SANGRE

Se recogió sangre de los pacientes en tubos separadores de suero con gel (TAPVAL® Monlab), y se mantuvieron en hielo hasta su procesamiento en el laboratorio. Una vez en el laboratorio, los tubos se centrifugaron a 1800g durante 15min a temperatura ambiente para obtener el suero. Éste se guardó alicotado a -20°C hasta el día de la valoración bioquímica.

▪ TEJIDOS ADIPOSOS

Se obtuvo tejido adiposo subcutáneo de los diferentes pacientes para la obtención de las ASC. El tejido se mantuvo en medio de transporte (*Dulbecco's Modified Eagle Medium* –DMEM–, Penicilina 100U/ml y Estreptomina 100µg/ml; Gibco®, todo de Life Technologies) hasta el aislamiento de las células.

3. ANÁLISIS DE LOS PARÁMETROS BIOQUÍMICOS

A partir de las muestras congeladas de suero, se determinaron los niveles séricos de varios parámetros bioquímicos para cada individuo: glucosa, colesterol total, triglicéridos, HDL, LDL, urea, proteínas totales, transamglutamato-oxalacetato transaminasa (GOT), glutamato-piruvato transaminasa (GPT) y creatinina. Para ello, se usaron los reactivos de bioquímica de la casa RAL, y se siguieron sus instrucciones.

4. OBTENCIÓN DE LAS ASC

Se aislaron ASC del tejido adiposo subcutáneo tanto de pacientes no-obesos (ASCn) como de pacientes obesos mórbidos (ASCmo). El aislamiento de las ASC se realizó siguiendo una modificación del protocolo previamente publicado por Zuck y col. (Zuk *et al.*, 2001).

Las soluciones que se utilizaron fueron:

- PBS1X (del inglés *Phosphate buffered saline*)
- Medio de digestión (DMEM + Colagenasa I-A 1mg/ml de Sigma-Aldrich)
- Medio completo (DMEM + 10% *Fetal bovine serum* –FBS– + Penicilina 100U/ml + Estreptomina 100µg/ml; todo de Gibco®, Life Technologies)

El protocolo que se siguió fue (Figura 16):

- i. El tejido adiposo se lavó extensivamente con PBS1X, se eliminaron los posibles restos de vasos y/o piel, y se pesó.
- ii. El tejido limpio se disgregó exhaustivamente con ayuda de un bisturí en una placa de Petri con 2ml de medio de digestión.

- iii. El tejido disgregado se puso en un falcon de 50ml con medio de digestión. Por cada 2gr de tejido obtenido se pusieron 10ml de medio de digestión. Se puso a digerir la grasa durante 1h, a 37°C y en agitación suave, en un horno giratorio precalentado previamente.
- iv. Una vez pasado el tiempo de digestión, se inhibió la acción de la colagenasa añadiendo el mismo volumen de medio completo. El falcon se centrifugó durante 10min a 280g y a 22°C para separar los adipocitos, que al flotar quedan en la fase superior, del SVF, que queda en forma de *pellet*.
- v. Una vez eliminados la fase superior de adipocitos y el resto del sobrenadante, se resuspendió el *pellet*, correspondiente al SVF, en 10ml de PBS1X.
- vi. La suspensión celular se filtró a través de un filtro de 100µm, y se centrifugó durante 10min a 280g y a 22°C. Se eliminó el sobrenadante celular y se volvió a resuspender el *pellet* en 10ml de medio completo.
- vii. Por último, se sembró la suspensión celular en 2 flascones de 25cm² (5ml/flascón) y se incubaron durante toda la noche a 37°C. Cada flascón se incubó bajo una condición de oxígeno diferente: normoxia (21% de O₂), e hipoxia (1% de O₂). Para el crecimiento en condiciones de normoxia se utilizó un incubador Nirco con un ambiente del 74% N₂, 5% CO₂ y 21% O₂; y para la condición de hipoxia se utilizó un incubador Hypoxic/Anoxic Workstation H35 de Don Whately Scientific Ltd. con una mezcla de gases del 1% O₂, 94% N₂ y 5% CO₂.

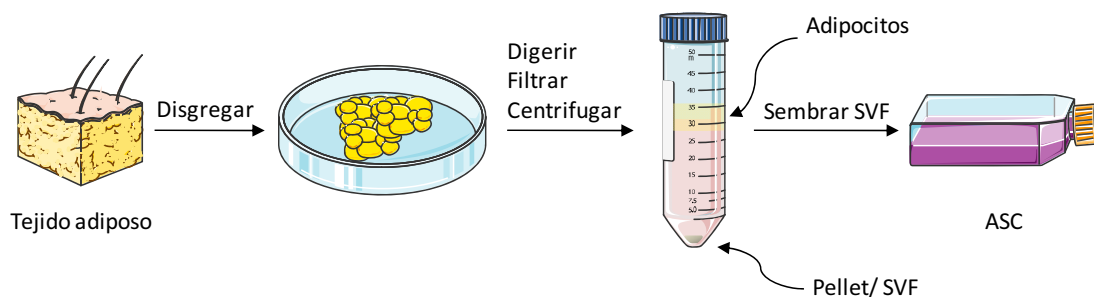


Figura 16. Esquema del método de aislamiento de las ASC a partir de un trozo de tejido adiposo. ASC, Células madre derivadas del tejido adiposo del inglés *Adipose-derived stromal/stem cells*; SVF, Fracción vascular del estroma del inglés *Stromal vascular fraction*.

- viii. Al día siguiente se cambió el medio a los flascones para eliminar las posibles células no adheridas. Las células adheridas correspondían a las ASC y se encontraban a pasaje 0. Para el mantenimiento del cultivo cada 2-3 días se cambió el medio a las células.
- ix. Una vez las células llegaron a la subconfluencia (75-90%), se levantaron y se resembraron para expandirlas. Para levantar las células se utilizó Tripsina-EDTA (Sigma-Aldrich). Las células fueron mantenidas siempre bajo sus condiciones de oxígeno iniciales.

- x. Tras levantar las células una segunda vez, se congelaron en N₂ líquido hasta su posterior utilización. Las células se congelaron a una densidad de 1x10⁶ cel/ml de medio de congelación (FBS + Dimetil sulfóxido 7,5%).

5. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA

Se analizó la presencia de marcadores de superficie característicos de las ASC tanto en el SVF como en las ASC de los dos tejidos adiposos de ambos grupos de pacientes. El SVF se analizó el día del aislamiento de las ASC, mientras que las células se analizaron una vez fueron aisladas y cultivadas: a pasaje 0 y pasaje 3. Se analizaron las células crecidas tanto en condiciones de normoxia como de hipoxia.

Para llevar a cabo el análisis se utilizó la técnica de citometría de flujo. Se analizaron los marcadores positivos característicos de las ASC: CD29 (*β1 Integrin*), CD105 (*Endoglin*), CD44 (*Hyaluronic acid/fibronectin receptor*) y CD90 (Thymus cell antigen-1); y los marcadores negativos CD34 y CD45 (*Leukocyte common antigen*). Se utilizaron anticuerpos monoclonales marcados con *fluorescein isothiocyanate* (FITC), *phycoerythrin* (PE) y *phycoerythrin Cyanin 5* (PC5): CD105-FITC, CD90-FITC, CD29-PE, CD44-FITC, CD45-PE, CD34-PC5, y utilizamos sus respectivos isotipos como control negativo para ajustar los voltajes (BD Biosciences).

La solución que se utilizó fue:

- Solución de citometría (PBS1X + Albúmina de suero bovino 3% + Azida sódica 0,1%)

El protocolo que se siguió fue:

- i. Partimos de una suspensión celular en PBS1X de 9x10⁶ de células, tanto del SVF como de las ASCn y ASCmo. La suspensión celular se centrifugó a 280g durante 10min y a 22°C, se resuspendió en 1ml de solución de citometría, y se volvió a centrifugar en las mismas condiciones.
- ii. Las células se resuspendieron en 900µl de solución de citometría y se repartieron en tubos de base redonda para citometría a una concentración de 10⁴-10⁶ células/tubo.
- iii. A cada tubo se le añadieron 10µl del anticuerpo correspondiente. Se dejó un tubo sin anticuerpo como control negativo para ajustar la posible autofluorescencia de las células y definir el tamaño celular.
- iv. Los tubos se incubaron 30min a 4°C y protegidos de la luz.

- v. La reacción se inhibió y se fijaron las células añadiendo 500µl/tubo de solución de citometría + paraformaldehído 0,1%.
- vi. Antes de adquirir las células del SVF, los eritrocitos se lisaron añadiendo 1ml de la solución QuickLysis (Cytognos) en cada tubo que se incubó durante 10min a temperatura ambiente en la oscuridad.
- vii. Por cada tubo se adquirieron y se analizaron 30.000 eventos celulares, determinados por su tamaño y complejidad, utilizando el citómetro de flujo Coulter EPICS XL y el programa Expo32 (Beckman Coulter).

6. ESTUDIO DEL CRECIMIENTO CELULAR

Se estudió la cinética de crecimiento (Jurgens *et al.*, 2008) de las ASCn y ASCmo crecidas tanto en normoxia como en hipoxia.

El medio que se utilizó fue:

- Medio completo (DMEM + 10% FBS + Penicilina 100U/ml + Estreptomicina 100µg/ml)

El protocolo que se siguió fue:

- i. Se sembraron ASC a pasaje 3, en medio completo, y en placas de cultivo celular de 6 pocillos a una concentración de 10^4 células/pocillo y 2ml de medio/pocillo. Se sembraron células de 5 individuos/grupo de pacientes.
- ii. Las células se cultivaron durante 10 días y se les cambió el medio cada 2 días.
- iii. Cada 2 días se levantaron las células con Tripsina-EDTA de 2 pocillos por cada condición y se contaron con una cámara de Neubauer. Este proceso se realizó durante 10 días.
- iv. Se relacionó el número de células obtenidas con el número de días que llevaban en cultivo para obtener una curva de crecimiento celular (Figura 17A). Calculamos la tasa de duplicación celular (PDT, del inglés *Population doubling time*) usando los datos de los días que las células habían pasado en la fase de "crecimiento exponencial". La PDT se calculó según la fórmula de la Figura 17B.

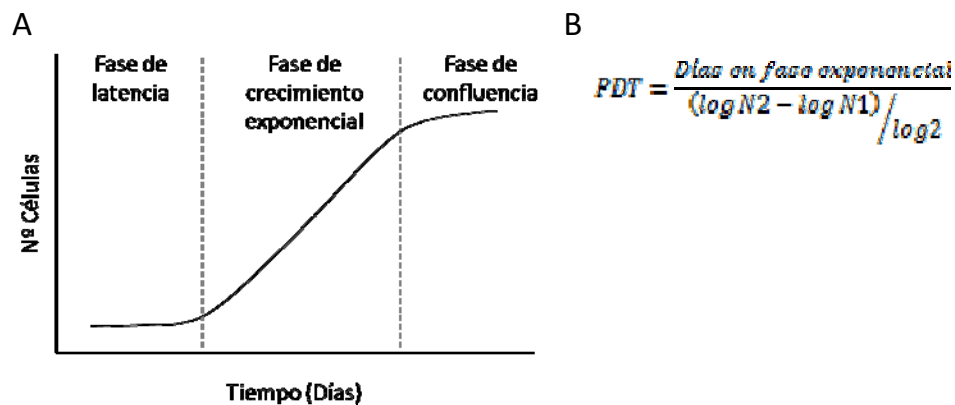


Figura 17. Cinética de crecimiento celular. (A) Curva de crecimiento celular típica de líneas celulares. Consta de diferentes fases del cultivo: fase de latencia (período *lag*), las células se fijan al sustrato e inician el ciclo celular; fase de crecimiento exponencial, el número de células se duplica; fase de confluencia, las células del cultivo dejan de dividirse. (B). Fórmula para calcular la tasa de duplicación celular (PDT, del inglés *Population doubling time*). N1 y N2 equivalen al número de células al principio y al final, respectivamente, de la fase de crecimiento exponencial (Jurgens *et al.*, 2008).

7. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE *THROMBOSPONDIN-1*

Se analizaron los niveles de *Thrombospondin-1* (TSP-1) en las ASC y se compararon entre las ASCn y ASCmo. Se analizaron los niveles de expresión de TSP-1 tanto a nivel génico (Ácido ribonucleico mensajero –mRNA, del inglés *Messenger Ribonucleic acid*–) y proteico (proteína total intracelular y proteína liberada al sobrenadante celular).

El medio que se utilizó fue:

- Medio completo (DMEM + 10% FBS + Penicilina 100U/ml + Estreptomicina 100µg/ml)

El protocolo que se siguió fue:

- i. Se sembraron ASCn y ASCmo (pasaje 3) en placas para cultivo celular de 6 pocillos (10^4 células/pocillo), y se cultivaron en condiciones de hipoxia hasta que llegaron a la subconfluencia (90%). Se les cambió el medio a las células cada 2-3 días.
- ii. Una vez las células estaban subconfluentes, se recogió el sobrenadante celular, se centrifugó a 280g durante 10min a 22°C, para eliminar los posibles restos celulares, y se guardó a -80°C hasta su posterior utilización.
- iii. Se lavaron los pocillos con PBS1X, y a cada pocillo se les añadió la solución correspondiente para obtener mRNA o proteína total (ver apartados 10.1. y 11.1. para los protocolos de obtención de mRNA y proteína total, respectivamente).

Utilizamos diferentes técnicas para medir los diferentes niveles de TSP-1: los niveles de expresión los determinamos mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR, del inglés *Polymerase chain reaction*) a tiempo real (ver apartado 10.4.); los niveles proteicos intracelulares se determinaron mediante la técnica de Western-blot (ver apartado 11.3.); y los niveles de proteína secretada se midieron mediante la técnica de inmunoensayo enzimático en fase sólida (ELISA, del inglés *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) utilizando el kit comercial Quantikine® Human Thrombospondin-1 (R&D Systems).

Para la realización de la ELISA se siguió el protocolo de la casa comercial, aunque previamente diluimos el sobrenadante ½. Los valores obtenidos en la ELISA se corrigieron por los mg de proteína total de cada sobrenadante.

8. ENSAYO DE FORMACIÓN DE TUBOS EN MATRIGEL

Se estudió el potencial angiogénico de las ASC *in vitro* y si éste variaba entre las ASCn y las ASCmo. Para ello, realizamos un ensayo de formación de tubos sobre Matrigel donde comparamos la capacidad de las Células Endoteliales de la Vena del Cordón Umbilical (HUVEC, del inglés *Human umbilical vein endothelial cells*) para formar redes tubulares en presencia del sobrenadante celular condicionado por las ASCn o las ASCmo.

Los diferentes medios que se utilizaron fueron:

- Medio-HUVEC 20% FBS (Medio 199 + FBS 20% + L-glutamina 1% + Suplemento de crecimiento endotelial + Piruvato 1% + Penicilina 100 U/ml + Estreptomicina 100 µg/ml; todo de Live Technologies).
- Medio-HUVEC 0% FBS.
- Sobrenadante celular de ASCn (8 pacientes diferentes) o ASCmo (16 pacientes diferentes). Las células fueron crecidas en condiciones de hipoxia.
- Medio completo de ASC no condicionado (DMEM + 10% FBS + Penicilina 100 U/ml + Estreptomicina 100 µg/ml)
- Matrigel con factores de crecimiento reducido (BD Bioscience).

El protocolo que se siguió fue:

- i. Se recubrieron los pocillos de una placa de cultivo celular de 96 pocillos con 50µl de Matrigel por pocillo.
- ii. Se incubó la placa a 37°C durante 30min.

- iii. En cada pocillo se sembraron 50 μ l de células HUVEC (400células/ μ l; a pasaje 5). Se utilizaron diferentes medios para sembrar las células y cada condición se sembró por triplicado:
 - Medio-HUVEC 20% FBS como control positivo.
 - Medio-HUVEC 0% FBS como control negativo.
 - Medio-HUVEC 20% complementado con sobrenadante condicionado de ASCn o ASCmo (1:1).
 - Medio-HUVEC 20% complementado con medio completo ASC no condicionado (1:1).
- iv. Las células se incubaron durante 30min a 37°C en condiciones de normoxia.
- v. A cada pocillo se le añadieron 25 μ l del medio correspondiente suplementado con el 10% de Matrigel.
- vi. Se incubaron las células durante 6h en condiciones de normoxia.
- vii. Se sacaron fotografías de cada pocillo y se cuantificó la longitud total de las estructuras tubulares formadas con el programa ImageJ 1.43u (NIH).

9. DIFERENCIACIÓN CELULAR

Para llevar a cabo los estudios de diferenciación celular de las ASC se utilizaron células ASCn (7 pacientes diferentes) y ASCmo (13 pacientes diferentes) que hubieran crecido en condiciones de hipoxia y a pasaje 3. Se sembraron 2×10^3 cells/cm² en cada pocillo de una placa de cultivo celular de 6 pocillos, por duplicado, y se dejaron crecer con medio completo de ASC (DMEM + 10% FBS + Penicilina 100U/ml + Estreptomocina 100 μ g/ml) en condiciones de hipoxia.

Una vez las células alcanzaron la confluencia, se les cambió el medio por un medio específico para cada diferenciación: Adipogénesis o Diferenciación endotelial.

9.1. DIFERENCIACIÓN ADIPOGÉNICA

La diferenciación adipogénica consistió en cultivar las células durante 21 días con el medio de diferenciación específico (DMEM + FBS 10% + Penicilina 100 U/ml + Estreptomocina 100 μ g/ml + 3-isobutil-1-metilxantina 0,5 mM + Dexametasona 1 μ M + Indometacina 200 μ M + Insulina 1,7 μ M; Life Technologies y Sigma-Aldrich). El medio se cambió cada 2-3 días. Las células se mantuvieron bajo condiciones de hipoxia durante todo el tratamiento.

Una vez acabado el tratamiento, se obtuvo mRNA para identificar marcadores característicos de célula adipocítica madura (LPL, *Lipoprotein lipase*; y FABP4, *Fatty Acid Binding Protein 4*) mediante PCR a tiempo real (ver apartados 10.1. y 10.4.). También se realizó una tinción de lípidos (Tinción de Herxheimer) para detectar la formación de vacuolas lipídicas.

El protocolo que se siguió para la Tinción de Herxheimer fue:

- i. Se fijaron las células con Formalina 10% durante 10 min a temperatura ambiente.
- ii. Se lavó cada pocillo con agua destilada.
- iii. Se lavó 2 veces cada pocillo con PBS1X.
- iv. Se incubó cada pocillo con agua del grifo (con sales) durante 3 min.
- v. Se incubó cada pocillo con agua destilada durante 1 min.
- vi. Se incubó cada pocillo, dos veces, con alcohol 50% durante 2 min.
- vii. Se incubó cada pocillo con la tinción de Herxheimer (Sudan III 0,5gr + Sudan IV 0,5gr + Alcohol 70° 50ml + Acetona 50ml), filtrada previamente, durante 5 min.
- viii. Se lavó cada pocillo rápidamente dos veces con alcohol 50%.
- ix. Se lavó cada pocillo con agua destilada. Las muestras se dejaron en agua destilada para sacar las fotos.

9.2. DIFERENCIACIÓN A CÉLULA ENDOTELIAL

La diferenciación a célula endotelial consistió en cultivar las células durante 7 días con el medio de diferenciación específico (Medio 199 + FBS 3% + Penicilina 100 U/ml + Estreptomicina 100 µg/ml + bFGF 10ng/µl + VEGF 50ng/µl). El medio se cambió cada 2-3 días. Las células se mantuvieron bajo condiciones de hipoxia durante todo el tratamiento.

Una vez acabado el tratamiento, se obtuvo mRNA para identificar marcadores característicos de célula endotelial (VEGFR1-2, *Vascular endothelial growth factor receptor 1-2*; vWF, *Von Willebrand factor*; y PECAM-1, *Platelet/endothelial cell adhesion molecule 1*) (ver apartados 10.1. y 10.4.). Además, se realizó un ensayo *in vitro* de formación de tubos sobre Matrigel para analizar la capacidad de estas células para formar neovasos. Se siguió el mismo protocolo que en el apartado 8 pero, en vez de HUVEC, se utilizaron ASCn y ASCmo no/diferenciadas a célula endotelial. El medio con el que se sembraron las células fue medio completo de ASC, las células se incubaron durante 7,5h.

10. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA

10.1. OBTENCIÓN DEL mRNA

Para llevar a cabo todas las extracciones del mRNA de las células se utilizaron las columnas con membrana de sílice del RNeasy Mini Kit de Qiagen, siguiendo las instrucciones de la casa comercial (resumen en la Figura 18). Posteriormente, se cuantificó el mRNA obtenido utilizando el ND-1000 Spectrophotometer de NanoDrop Technologies Inc.

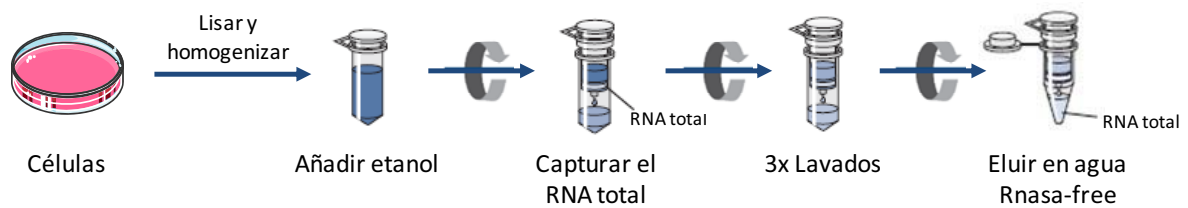


Figura 18. Esquema resumen del proceso de extracción del RNA a partir de células en cultivo. Se utilizó el RNeasy Mini Kit de Qiagen.

10.2. GENECHIP® DE AFFYMETRIX

Se realizó un análisis de expresión del genoma completo de las ASC de 3 pacientes no-obesos y de 3 pacientes obesos. Todas las células fueron cultivadas a pasaje 3 y en condiciones de hipoxia. Para llevar a cabo el estudio se utilizaron los microarrays GeneChip® Human Gene 1.0 ST Arrays (Affymetrix).

Después de obtener y cuantificar el mRNA, se analizó su calidad usando el Agilent 2100 Bioanalyzer junto con el Agilent RNA 6000 Nano Kit, ambos de Agilent Technologies. La calidad se valoró mediante el valor RIN (*RNA integrity number*) que utiliza valores del 1 al 10, siendo 10 un RNA sin nada de degradación. Sólo se aceptaron las muestras de mRNA con un RIN superior a 7, y preferentemente aquellas con un mismo RIN.

Utilizando el Ambion WT Expression Kit (Ambion, Life Technologies) se amplificaron 200ng de RNA total (mRNA mezclado con controles poly-A; Affymetrix) (Figura 19). Para ello, se sintetizó cDNA (del inglés *complementary Deoxyribonucleic acid*) de doble cadena (dscDNA, del inglés *double-stranded cDNA*), y mediante transcripción *in vitro* se obtuvo una mayor cantidad de cRNA (del inglés *complementary Ribonuclei acid*). A partir de 10µg de cRNA se sintetizó cDNA de cadena simple (de segundo ciclo), y 5,5µg de este cDNA se fragmentó y se marcó con biotina utilizando el WT Terminal

Labeling Kit (Affymetrix). Posteriormente, se añadieron a la muestra marcada los controles de hibridación del Hybridization, Wash and Stain Kit (Affymetrix).

Cada muestra se hibridó en un microarray durante 16h, a 45°C y a 60rpm. Las hibridaciones, los lavados y el marcaje de los microarrays se realizaron siguiendo las instrucciones de la casa comercial y utilizando el Affymetrix GeneChip® 3000 7G System (incluye el GeneChip® Scanner 3000 7G, la Fluidics Station 450, el Hybridization Oven 645 y una estación de trabajo con el Affymetrix® GeneChip® Command Console® Software).

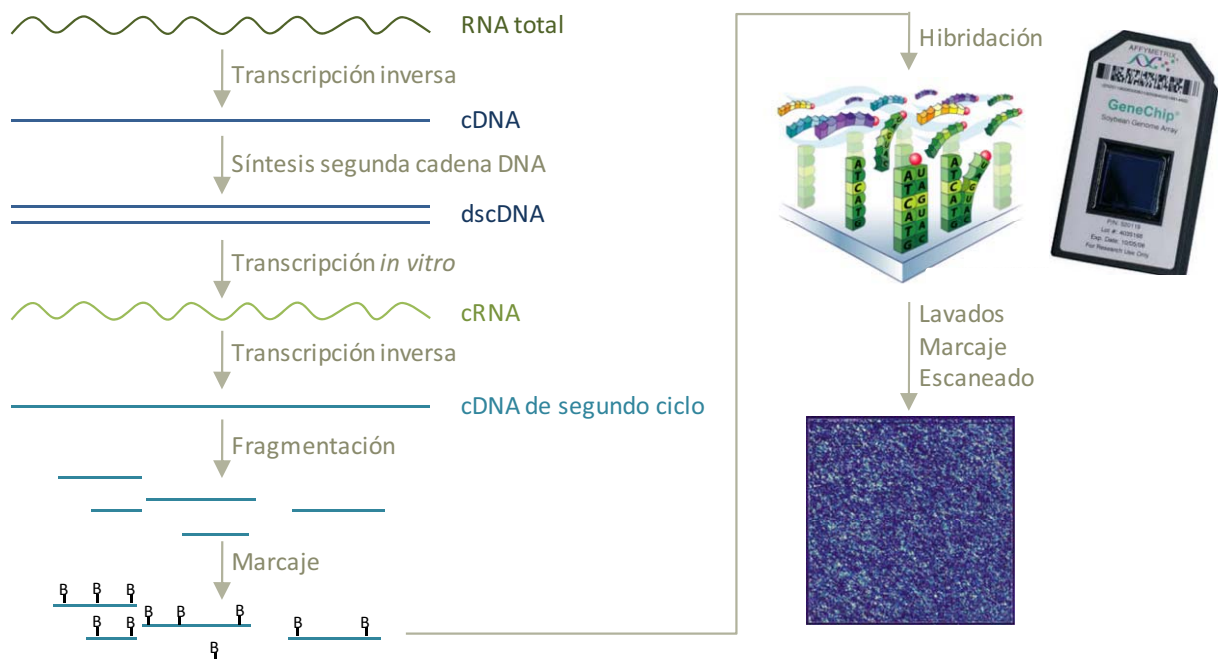


Figura 19. Análisis del transcriptoma usando Microarrays de DNA. Esquema del proceso de síntesis, amplificación y marcaje del cDNA, e hibridación de un microarray GeneChip® de Affymetrix. B, Biotina del inglés *Biotin*; cDNA/RNA, del inglés *complementary Deoxyribonucleic acid/Ribonuclei acid*; dscDNA, del inglés *double-stranded cDNA*.

10.3. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO

Se utilizaron análisis bioinformáticos para analizar los resultados obtenidos de los microarrays. Los análisis de control de calidad se realizaron usando el programa Integromics Biomarker Discovery (Integromics). Para el análisis estadístico se utilizó el programa Partek Genomics Suite (Partek Inc.). Usamos el Análisis de componentes principales (PCA, del inglés *Principal component analysis*), que es una técnica estadística descriptiva, para relacionar el conjunto de las muestras analizadas por microarray en función de la variabilidad en la expresión genética global. Este análisis reduce la dimensionalidad de las muestras a 3 dimensiones, donde se le asigna a cada muestra una representación tri-dimensional basada en sus 3 primeros componentes principales que caracterizan la mayoría de los genes expresados.

Se realizó un análisis de la varianza (ANOVA, del inglés *Analysis of variance*) modificado por Partek Inc. para realizar el análisis estadístico entre el grupo de células estudiadas. Los p-valores obtenidos se ajustaron con el método de Benjamini y Hochberg (Benjamini and Hochberg, 1995) para estudios de comparaciones múltiples, dando lugar al *False Discovery Rate* (FDR). Para definir qué genes se expresaban significativamente, se seleccionaron aquellos que presentaran un $FDR < 0,6$ y un ratio de expresión $\geq \pm 1,5$. Para ello utilizamos tanto la información de la base de conocimiento de Ingenuity® Systems (www.ingenuity.com) así como de diversas publicaciones.

A partir de la información encontrada, se seleccionó un grupo de genes que validamos posteriormente en ASC de diversos individuos mediante PCR a tiempo real (explicada en el punto 10.4). Una vez analizados los genes con una expresión significativamente diferente, se realizó un estudio de las vías de señalización en las que podrían estar implicados estos genes usando el programa Pathway Analysis de Ingenuity® (IPA). A partir de la información obtenida, definimos posibles interacciones proteicas (directas o indirectas) entre nuestros genes modificados y otras proteínas para intentar explicar la situación observada en nuestras células.

10.4. PCR A TIEMPO REAL

Mediante la técnica de PCR a tiempo real se validaron los genes significativos seleccionados del microarray, así como se analizaron otros genes de interés (Tabla 8). Para ello se utilizaron tarjetas microfluídicas (TaqMan® Array Micro Fluidic Cards) de 384 pocillos, diseñadas por nosotros, así como *assays* comerciales individuales (TaqMan® Gene Expression Assays) (explicados en los puntos 10.4.1 y 10.4.2, respectivamente)

A partir de 0,5-1 µg de mRNA se realizó la síntesis de cDNA por retrotranscripción, utilizando el High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). Para un volumen final de 20 µl utilizamos:

- 10 µl muestra (0,5-1 µg mRNA, ajustado con agua *RNasa-free*)
- 2 µl reverse transcription Buffer 10X
- 0,8 µl Mezcla de desoxirribonucleótidos trifosfato 25X
- 2 µl reverse transcription Random Primers 10X
- 1 µl MultiScribe™ Reverse Transcriptase
- 4,2 µl agua *RNasa-free*

La transcripción inversa se llevó a cabo en un termociclador (Applied Biosystems® GeneAmp® PCR System 9700) programado con los siguientes ciclos: 10 min a 25°C, 2h a 37°C, 5min a 85°C, y ∞ a 4°C.

La PCR a tiempo real se realizó usando el equipo 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Independientemente de si se usaban tarjetas microfluídicas o *assays* individuales, se siguieron los siguientes ciclos: desnaturalización inicial a 95°C durante 10min, y 40 ciclos de amplificación que constan de 15sg de desnaturalización a 95°C y 1min de reasociación/polimerización a 60°C.

Assays utilizados			Assays utilizados		
Símbolo	Código	Nombre del gen	Símbolo	Código	Nombre del gen
ACTA2	Hs00909449_m1	<i>Actin, alpha 2, smooth muscle, aorta</i>	LIF	Hs00171455_m1	<i>Leukemia inhibitory factor</i>
CCL2	Hs00234140_m1	<i>Monocyte chemotactic protein 1 (MCP-1)</i>	LPL	Hs00173425_m1	<i>Lipoprotein lipase</i>
CXCL12	Hs00171022_m1	<i>Chemokine ligand 12; stromal cell-derived factor 1 (SDF-1)</i>	OLR1	Hs00234028_m1	<i>Oxidized low density lipoprotein receptor 1</i>
DAPK1	Hs00234480_m1	<i>Death-associated protein kinase 1</i>	PECAM1	Hs001697777_m1	<i>Platelet/endothelial cell adhesion molecule 1 (CD31)</i>
FABP4	Hs01086177_m1	<i>Fatty acid binding protein 4</i>	PITX2	Hs00165626_m1	<i>Paired-like homeodomain transcription</i>
FLT1	Hs01052937_m1	<i>Vascular endothelial growth factor receptor 1 (VEGFR1)</i>	RUNX2	Hs01047976_m1	<i>Runt-related transcription factor 2</i>
HAPLN1	Hs00157103_m1	<i>Hyaluronan and proteoglycan link protein 1</i>	TBX15	Hs00537087_m1	<i>T-box 15</i>
HOXC10	Hs00213579_m1	<i>Homeobox C10</i>	TCF21	Hs00162646_m1	<i>Transcription factor 21</i>
IL1B	Hs00174097_m1	<i>Interleukin 1 β</i>	TNFRSF11B	Hs00171068_m1	<i>Tumor necrosis factor receptor superfamily member 11b</i>
IL8	Hs00174103_m1	<i>Interleukin 8</i>	THBS1	Hs00962908_m1	<i>Thrombospondin 1</i>
KDR	Hs00911703_m1	<i>Vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2)</i>	vWF	Hs00169795_m1	<i>von Willebrand factor</i>

Tabla 8. Listado de los *assays* utilizados.

10.4.1. TARJETAS MICROFLUÍDICAS

Las TaqMan® Array Micro Fluidic Cards son tarjetas de 384 pocillos donde se les ha introducido previamente a cada pocillo un *assay* individual (Figura 20A). Estas tarjetas permiten analizar una gran cantidad de genes a la vez, por lo que son muy utilizadas para validar resultados de microarrays. Además, el volumen de muestra utilizado es muy pequeño en comparación con el utilizado con los *assays* individuales.

Las tarjetas utilizadas en este estudio fueron diseñadas por nosotros, eligiendo los *assays* que queríamos incluir en cada pocillo, siempre y cuando fueran *assays* inventariados de Applied Biosystems. Cargamos y analizamos las tarjetas siguiendo las instrucciones de la casa comercial, y usando el equipo 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems).

En nuestro estudio se utilizaron 200ng de mRNA de cada muestra por cada puerto cargado (se pueden cargar desde 30 hasta 500ng de mRNA) (Figura 20A). En la Figura 20B se esquematiza el

protocolo que se siguió para cargar estas placas. En cada puerto se cargaron 95 μl de la mezcla de la muestra + agua + TaqMan® master mix (50 μl de cDNA con agua+50 μl de Master Mix).

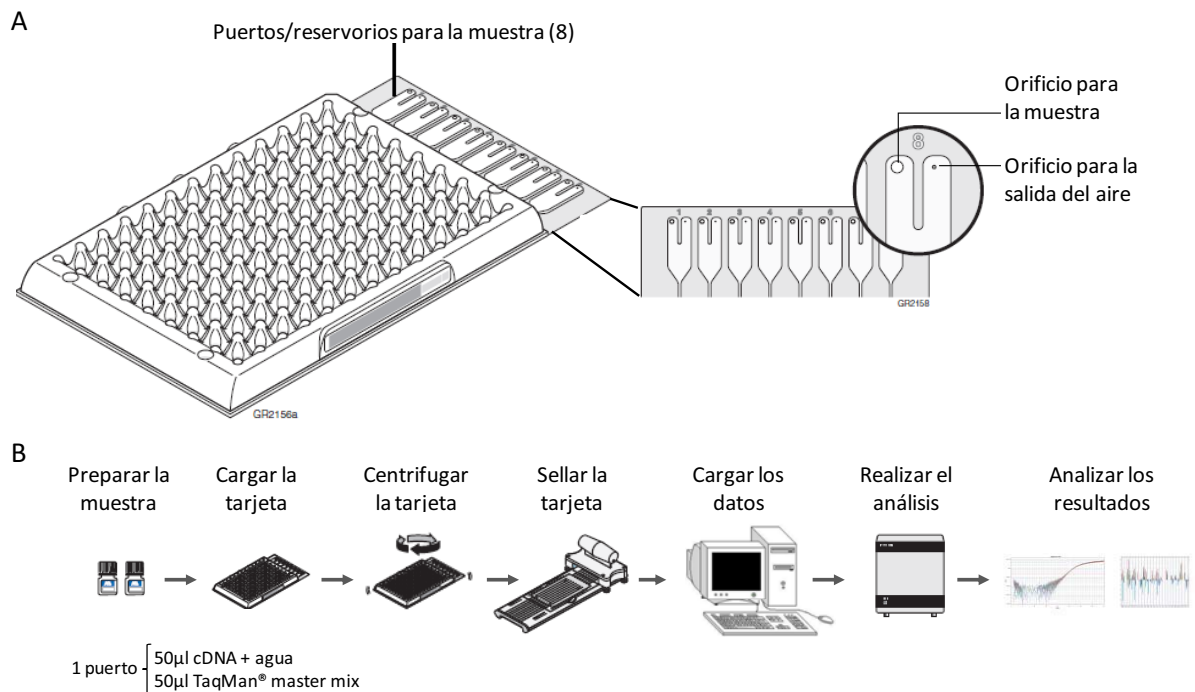


Figura 20. TaqMan® Array Micro Fluidic Cards. **(A)** Esquema de una tarjeta microfluidica de Applied Biosystems. **(B)** Esquema del protocolo a seguir para analizar la expresión de genes utilizando tarjetas microfluidicas. Figura modificado de Applied Biosystems. cDNA, del inglés *complementary DNA*.

Una vez obtenidos los resultados, se calculó la expresión relativa de los genes de interés mediante el método de Ct comparativo, también llamado el método de $\Delta\Delta\text{CT}$, con el que se relacionan los valores Ct de los genes de interés con los valores Ct de un gen endógeno: $2^{-(\text{Ct}_{\text{gen}} - \text{Ct}_{\text{endógeno}})}$ (Livak and Schmittgen, 2001). La expresión de los genes se normalizó con el gen endógeno TATA-binding protein (TBP, Hs00920494_m1).

10.4.2. ASSAYS INDIVIDUALES

Se utilizaron *assays* individuales prediseñados por Life Technologies para validar algunos genes de los microarrays, así como para analizar la expresión de otros genes de interés.

Los volúmenes de muestra, assay y enzima TaqMan® master mix fueron diferentes de los utilizados con las tarjetas microfluidicas. Para 20 μl totales:

- 1 μl cDNA
- 8 μl agua
- 1 μl assay

- 10 µl TaqMan® Master Mix 2X

Se usaron microplacas de 384 pocillos, y en cada pocillo se cargaron 10 µl de la mezcla preparada, haciendo duplicados por cada muestra y cada gen. La expresión relativa de los genes también se calculó mediante el método de Ct comparativo, y se normalizó usando el gen TBP como gen endógeno.

11. EXPRESIÓN PROTEICA

Para analizar la expresión de diversas proteínas utilizamos la técnica de Western-blot. Para ello, y en función de la proteína de interés, se obtuvieron diversas fracciones proteicas celulares: proteína total, proteína de la fracción citoplasmática, y proteína de la fracción nuclear.

11.1. PROTEÍNA TOTAL

Para obtener la proteína total de las células se lisaron las células con la solución de lisis Ripa Buffer.

La solución que se utilizó fue:

- PBS1X
- RIPA Buffer (50mM Tris-HCl 0,5M pH=6,8 + 150mM NaCl + 1% NP-40 + 0,5% Sodium Deoxycholate + 0,1% SDS; pH=8)

El protocolo que se siguió fue:

- Se lavaron las células con PBS1X y se lisaron añadiendo 150µl de solución Ripa Buffer por cada placa de Petri de 60mm.
- Para ayudar a lisar las células, se pasó el homogenado varias veces por una jeringuilla con una aguja de 20g.
- Se añadió Nuclease Mix (GE Healthcare), 1/100, y las muestras se guardaron a -20°C hasta su posterior análisis.

11.2. SUBFRACCIONAMIENTO CELULAR

Realizamos un subfraccionamiento celular para obtener las fracciones proteicas del citoplasma y del núcleo, y así poder estudiar la distribución celular de diversos factores de transcripción. El

subfraccionamiento celular se realizó siempre en hielo para evitar la desnaturalización de las proteínas.

Las soluciones que se utilizaron fueron:

- PBS1X
- CSK (NaCl 50mM + Pipes pH6,8 10mM + MgCl₂ 3mM + Tritón x100 0,0% + Sacarosa300mM + coctel de inhibidores de proteasas de Roche)
- Solución sol/Insol (Tris HCl 15mM + EDTA 5mM + EGTA 2,5mM + SDS 1%)

El protocolo que se siguió se basó en el de Hinck y col. (Hinck *et al.*, 1994):

- i. Se sembraron las células en placas de Petri de 60mm con el medio correspondiente y se dejaron crecer hasta la subconfluencia en condiciones de hipoxia.
- ii. Se lavaron las células con PBS1X y se dejaron en 1ml de la solución CSK, en agitación durante 20min a 4°C.
- iii. Las células se rascaron, se recogieron, y se centrifugaron durante 10min a 15.700g y a 4°C.
- iv. Se recogió el sobrenadante, que correspondía a la fracción soluble del citoplasma, y se guardó a -20°C hasta su posterior análisis.
- v. Se resuspendió el pellet en 100µl de la solución sol/Insol y se calentó durante 10min a 100°C.
- vi. Se añadió 100µl de la solución CSK, y esta fracción correspondió a la fracción nuclear. Se guardó a -20°C hasta su posterior análisis.

11.3. WESTERN-BLOT

Antes de analizar las muestras por western-blot, se determinó la concentración proteica de cada fracción mediante el 2-D Quant Kit, siguiendo las instrucciones de la casa comercial. Dependiendo de si la proteína que se quería detectar era más o menos abundante en el extracto proteico, para el western-blot se utilizaron desde 10 a 25µg de proteína.

Se separaron las proteínas mediante electroforesis en geles de acrilamida (SDS-PAGE), descrita por Laemmli y col. (Laemmli, 1970). Los geles estaban formados por un gel concentrador del 4% de Acrilamida-Bisacrilamida, y un gel separador del 4-15% de Acrilamida-Bisacrilamida en función del peso molecular de las proteínas. Las proteínas se resuspendieron en una solución de carga 6X +/- β-mercaptoetanol, en función de si eran condiciones desnaturalizantes o no (Tris-HCl 125mM, SDS 2% (p/v), Glicerol 5% (v/v), azul de bromofenol 0,003% (p/v) y H₂O; pH 6,8). Para las condiciones

desnaturalizantes, las muestras con solución de carga se calentaron durante 5min a 97°C en un bloque seco.

Una vez se cargaron las proteínas en los geles, la electroforesis se realizó a 120 volts durante 1,5-2h. Posteriormente las proteínas se transfirieron a una membrana nitrocelulosa 0,45mm (Bio-Rad) durante 2h a 400mA y a 4°C.

Para la incubación de los diferentes anticuerpos, previamente las membranas se bloquearon durante 1h a temperatura ambiente en agitación con 7ml de solución de bloqueo (5% de leche desnatada o de albúmina de suero bovino en tampón TBS 1X-Tween 20 0,05%). Seguidamente, se incubaron con 7ml de anticuerpo primario diluido en la solución de bloqueo durante toda la noche en agitación suave a 4°C. Cada anticuerpo se incubó a una concentración diferente. Después, las membranas se lavaron 2 veces durante 10min con tampón TBS1X-Tween20 0,05% y otras 2 veces con tampón TBS1X. Y, finalmente, se incubaron las membranas con el anticuerpo secundario correspondiente (todos de Dako), diluido 1/10000 en la solución de bloqueo durante 1h y a temperatura ambiente. La inmunodetección se realizó con la solución Supersignal (Pierce).

Los anticuerpos primarios utilizados fueron:

- TSP-1, producido en ratón, dilución 1/1000 (Abcam).
- Fosfo-Smad2/3, producido en cabra, dilución 1/500 (Santa Cruz Biotechnology).
- β -Tubulina, producido en conejo, dilución 1/1000 (Abcam). Este anticuerpo se utilizó como control de carga en los western-blot de proteína total, y como control de la fracción citoplasmática en los western-blot de las muestras de subfraccionamiento celular.
- Histona H1, producido en ratón, dilución 1/1000 (Millipore). Este anticuerpo se utilizó como control de la fracción nuclear en los western-blot de las muestras de subfraccionamiento celular.

La expresión proteica se cuantificó mediante el programa Image Lab TM (Bio Rad). La translocación nuclear de los factores de transcripción se calculó relacionando los niveles de proteína nuclear respecto los niveles de proteína total (proteína nuclear + citoplasmática).

IV. RESULTADOS

ARTÍCULO 1

The subcutaneous adipose tissue reservoir of functionally active stem cells is reduced in obese patients.

Blanca Oñate^{*,†}, Gemma Vilahur^{*,†}, Raquel Ferrer-Lorente^{*,†}, Juan Ybarra[‡], Alberto Díez-Caballero[§], Carlos Ballesta-López[¶], Fabrizio Moscatiello^{||}, Javier Herrero^{||}, and Lina Badimon^{*,†}

* Cardiovascular Research Center, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain.

† Centro de Investigación Biomédica en Red de Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición (CIBERObn)– Pathophysiology of Obesity and Nutrition, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain.

‡ Resistencia a la Insulina SL, Barcelona, Spain.

§ Quirúrgica Cirujanos Asociados.

|| Department of Plastic Surgery, Centro Médico Teknon, Barcelona, Spain.

¶ Centro Laparoscópico Doctor Ballesta S.L.U, Barcelona, Spain.

The FASEB Journal, October 2012, 26(10):4327-4336.

Factor de Impacto: 5,704

RESUMEN

Se ha demostrado que el tejido adiposo, un tejido metabólicamente muy activo, es un reservorio de células madre mesenquimales. El uso de las células madre derivadas del tejido adiposo (ASC) para la reparación y la regeneración tisular ha tenido un gran éxito debido a su fácil accesibilidad y la gran cantidad de muestra obtenida. Sin embargo, la capacidad funcional de las ASC de individuos con diferentes grados de adiposidad aún no se ha investigado. Nuestra hipótesis es que las ASC del tejido adiposo de pacientes con síndrome metabólico y una elevada adiposidad pueden verse afectadas funcionalmente.

Nosotros hemos observado que la fracción vascular del estroma del tejido adiposo subcutáneo de individuos no-obesos presenta un número significativamente más elevado de células CD90⁺ en comparación con la fracción vascular del estroma del tejido adiposo de pacientes obesos. Además, las ASC aisladas del tejido adiposo de pacientes obesos muestran un menor potencial de diferenciación y una menor capacidad proangiogénica.

Por lo tanto, las ASC del tejido adiposo derivadas de pacientes obesos presentan una menor capacidad para la regeneración terapéutica o espontánea en comparación con las ASC derivadas de individuos metabólicamente sanos.

The subcutaneous adipose tissue reservoir of functionally active stem cells is reduced in obese patients

Blanca Oñate,^{*,†} Gemma Vilahur,^{*,†} Raquel Ferrer-Lorente,^{*,†} Juan Ybarra,[‡] Alberto Díez-Caballero,[§] Carlos Ballesta-López,[¶] Fabrizio Moscatiello,^{||} Javier Herrero,^{||} and Lina Badimon^{*,†,1}

*Cardiovascular Research Center, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain; †Centro de Investigación Biomédica en Red de Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición (CIBERObn)–Pathophysiology of Obesity and Nutrition, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain; ‡Resistencia a la Insulina SL, Barcelona, Spain; §Quirúrgica Cirujanos Asociados and ||Department of Plastic Surgery, Centro Médico Teknon, Barcelona, Spain; and ¶Centro Laparoscópico Doctor Ballesta S.L.U, Barcelona, Spain

ABSTRACT It has been demonstrated that the adipose tissue, a highly functional metabolic tissue, is a reservoir of mesenchymal stem cells. The potential use of adipose-derived stem cells (ADSCs) from white adipose tissue (WAT) for organ repair and regeneration has been considered because of their obvious benefits in terms of accessibility and quantity of available sample. However, the functional capability of ADSCs from subjects with different adiposity has not been investigated. It has been our hypothesis that ADSCs from adipose tissue of patients with metabolic syndrome and high adiposity may be functionally impaired. We report that subcutaneous WAT stromal vascular fraction (SVF) from nonobese individuals had a significantly higher number of CD90⁺ cells than SVF from obese patients. The isolated ADSCs from WAT of obese patients had reduced differentiation potential and were less proangiogenic. Therefore, ADSCs in adipose tissue of obese patients have lower capacity for spontaneous or therapeutic repair than ADSCs from nonobese metabolically normal individuals.—Oñate, B., Vilahur, G., Ferrer-Lorente, R., Ybarra, J., Díez-Caballero, A., Ballesta-López, C., Moscatiello, F., Her-

rero, J., Badimon, L. The subcutaneous adipose tissue reservoir of functionally active stem cells is reduced in obese patients. *FASEB J.* 26, 4327–4336 (2012). www.fasebj.org

Key Words: thrombospondin 1 • cardiovascular risk factors • hypoxia • proliferation • angiogenesis • differentiation

ADIPOSE TISSUE, TRADITIONALLY regarded as an energy storage organ, is now considered an endocrine tissue and a source of adult stem cells, adipose-derived stem cells (ADSCs; ref. 1). ADSCs share many properties with the well-described bone marrow mesenchymal stem cells (BM-MSCs), including *ex vivo* expansion, differentiation capacity, and mesenchymal characteristic lineage markers (2). However, in contrast to BM-MSCs, ADSCs can be easily isolated from human subcutaneous adipose tissue and in great quantities (3), which makes them an attractive alternative for cell therapy purposes. Among the most interesting characteristics of ADSCs is their potential to stimulate angiogenesis, reduce apoptosis, and exert anti-inflammatory properties, which suggests an active role of ADSCs in revascularization of ischemic damaged tissues (4–8). Most of these effects are believed to be mediated *via* paracrine activity.

At present, age, adipose tissue depot site, and gender have been shown to modify the number and the proliferation, differentiation, and angiogenic capacity of ADSCs (9–13). However, the effect of cardiovascular risk factors on ADSC potential has not been previously addressed. Indeed, several human studies have demonstrated that hypercholesterolemia, diabetes, and hypertension impair the number and function of bone

Abbreviations: ADSC, adipose-derived stem cell; ADSCmo, adipose-derived stem cell from morbidly obese patient; ADSCn, adipose-derived stem cell from nonobese individual; AU, arbitrary unit; BMI, body mass index; BM-MSC, bone marrow mesenchymal stem cell; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; EC, endothelial cell; FABP4, fatty acid binding protein 4; FBS, fetal bovine serum; HDL, high-density lipoprotein; HUVEC, human umbilical vein endothelial cell; LDL, low-density lipoprotein; LPL, lipoprotein lipase; mAb, monoclonal antibody; MSC, mesenchymal stem cell; PCR, polymerase chain reaction; PDT, population doubling time; PECAM-1, platelet endothelial cell adhesion molecule 1; P/S, penicillin/streptomycin; SVF, stromal vascular fraction; TBP, TATA-binding protein; TSP-1, thrombospondin 1; VEGFR1, vascular endothelial growth factor receptor 1; VEGFR2, vascular endothelial growth factor receptor 2; vWF, von Willebrand factor; WAT, white adipose tissue

¹ Correspondence: Cardiovascular Research Center (CSIC-ICCC), Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Av. S. Antoni M. Claret 167, 08025 Barcelona, Spain. E-mail: lbadimon@csic-iccc.org
doi: 10.1096/fj.12-207217

marrow-derived circulating progenitor cells (14–21). Yet, the effect of different degree of adiposity and/or metabolic syndrome on the functional capability of adult stem cells—particularly in ADSCs—has not been investigated. We hypothesized that human ADSCs from obese patients with metabolic syndrome may have impaired capabilities for spontaneous or therapeutic tissue repair. Here we report that ADSCs from white adipose tissue (WAT) of patients with obesity and metabolic syndrome have lower proliferative and angiogenic potential than ADSCs from WAT of nonobese metabolically normal individuals.

MATERIALS AND METHODS

Subjects

Subcutaneous WAT was obtained from morbidly obese patients [body mass index (BMI) >40 kg/m²; *n*=16] that underwent bypass gastric surgery and from nonobese patients (BMI <25 kg/m²; *n*=8) who underwent liposuction surgery. During the procedures, bypass gastric surgery patients were kept with isoflurane (2%), whereas liposuction surgery was performed under propofol/ramifenitil. Tissues were obtained with informed consent from patients, and the study protocol was approved by the Centro Medico Teknon Ethical Committee, consistent with the principles of the Declaration of Helsinki. Blood samples from all subjects were obtained at the time of intervention in order to evaluate the following biochemical parameters: glucose, triglyceride, total cholesterol, high-density lipoprotein (HDL) cholesterol, low-density lipoprotein (LDL) cholesterol, urea, total proteins, glutamic oxaloacetic transaminase, glutamic pyruvic transaminase, and creatinine levels. Patients used regular medication as recommended in the guidelines if it was necessary.

Cell isolation and culture

Isolation of ADSCs was performed with a modified method of a previously described technique (1). Briefly, adipose tissue was washed, minced, and digested with 1 mg/ml collagenase I-A (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Gibco; Life Technologies, Inc., Grand Island, NY, USA) for 1 h at 37°C with gentle agitation. The digested tissue was sequentially filtered through a 100- μ m mesh and centrifuged for 10 min at 1200 rpm at room temperature. The supernatant, containing mature adipocytes, was aspirated, and the pellet was identified as the stromal vascular fraction (SVF). SVF was resuspended in culture medium [DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and 100 U/ml penicillin and 100 μ g/ml streptomycin (P/S); Gibco] and seeded. Finally, cells were incubated overnight at 37°C with 5% CO₂ under two different oxygen conditions: normoxic (21% O₂) and hypoxic (1% O₂). At 24 h after incubation, the medium was changed to remove nonadherent cells. Adherent cells were referred as ADSCs. For ADSC expansion, medium was changed every 2–3 d. Cells were always maintained under the original oxygen condition in all passages.

Flow cytometry characterization

Surface marker analysis of the SVF, ADSCs from nonobese individuals (ADSCns), and ADSCs from morbidly obese pa-

tients (ADSCmos), cultured under normoxic and hypoxic conditions (passage 3), was performed by using the fluorescein isothiocyanate- or phycoerythrin-conjugated monoclonal antibodies (mAbs) against CD105, CD90, CD29, CD44, CD45, and CD34 and their respective isotype control mAbs (BD Biosciences, San Diego, CA, USA). Briefly, the cell suspension was washed and resuspended with 1 \times PBS supplemented with 3% bovine serum albumin (BSA; Sigma-Aldrich) and 0.1% sodium azide. Cells (10⁶) were incubated with the specific mAbs at 4°C for 30 min, fixed with 1 \times PBS supplemented with 3% BSA, 0.1% sodium azide, and 0.1% paraformaldehyde and analyzed by flow cytometry. Before acquiring SVF cells, erythrocytes were lysed with 1 ml of quick lysis solution (Cytognos, Salamanca, Spain). At least 3 \times 10⁴ events were acquired from each sample.

Growth kinetics of ADSCs

To determine the growth kinetics of cultured ADSCs, wells were seeded with 10⁴ cells/well (passage 3) and cultured under both normoxic and hypoxic conditions, as described previously (22). Cells from 2 duplicate wells were harvested and counted every other day. ADSC numbers were plotted against the number of days cultured. The exponential-growth phase was determined, and population doubling time (PDT) was calculated using the formula $PDT = T_e / [(\log N_2 - \log N_1) / \log 2]$, where T_e is time (d) in the exponential-growth phase, N_1 is the number of cells at the beginning of the exponential-growth phase, and N_2 is the number of cells at the end of the exponential-growth phase.

Relative real-time polymerase chain reaction (PCR) and gene expression

Total RNA was extracted from undifferentiated ADSCns and ADSCmos, and from adipocyte- and endothelial cell (EC)-differentiated ADSCns and ADSCmos by using the RNeasy Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) according to the manufacturer's protocol. The High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems; Life Technologies, Foster City, CA, USA) was used for reverse transcription of RNA. The expression of adipocyte [lipoprotein lipase (LPL) and fatty acid binding protein 4 (FABP4)] and EC markers [platelet EC adhesion molecule 1 (PECAM-1), vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2), VEGFR1, and von Willebrand factor (vWF)] and thrombospondin 1 (TSP-1) were evaluated at the mRNA level by PCR assays (Applied Biosystems, Life Technologies), conducted according to the manufacturer's instructions. Relative gene expression values were calculated by the $\Delta\Delta C_t$ method. The raw gene expression values were normalized according to the expression of TATA-binding protein (TBP) gene.

Western blotting

Whole-cell extracts of ADSCns and ADSCmos cultured under hypoxic conditions were made in RIPA buffer. Total protein in cell extracts was determined, and 25 μ g cell lysate was subjected to electrophoresis on 8% gels and then transferred to nitrocellulose membrane. After blocking in 5% nonfat milk 1 h at room temperature, blots were incubated with TSP-1 antibody (1:1000; mouse mAb; Abcam, Cambridge, UK) at 4°C overnight. Secondary antibody consisted of horseradish peroxidase-conjugated antibodies (Dako, Glostrup, Denmark) and was detected using the SuperSignal chemiluminescence system (Pierce; Rockford, IL, USA). Protein expression was determined using Image Lab software (Bio-

Rad, Richmond, CA, USA), and β -tubulin (Abcam) was used for protein loading control.

TSP-1 ELISA

Conditioned medium of ADSCns and ADSCmos cultured under hypoxic conditions was collected, and TSP-1 was quantified using a Quantikine kit (R&D Systems; Abingdon, UK), according to the manufacturer’s protocol. All values were normalized to total medium protein.

In vitro tube formation assay

Conditioned medium was collected from ADSCns and ADSCmos cultured under hypoxic conditions. Human umbilical vein ECs (HUVECs) at passage 5 were seeded in 96-well plates coated with growth factor-reduced Matrigel (BD Biosciences) at a density of 2×10^4 cells/well. HUVEC growth medium was supplemented with conditioned medium (1:1). At least 3 wells were used for each sample of conditioned medium. HUVEC serum-free growth medium and nonconditioned ADSC culture medium were used as a negative control; HUVEC growth medium (20% FBS) served as positive control. Plates were incubated at 37°C with 5% CO₂ and 21% O₂ for 6 h. Total length of tubular structures was counted with ImageJ 1.43u software (U.S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

In vitro cell differentiation

For differentiation studies, ADSCs at passage 3 and cultured under hypoxic conditions were plated at a density of 2×10^3 cells/cm² on 6-well culture plates and were allowed to grow to confluence. The culture medium was then replaced with the specific differentiation medium, which was changed every 2–3 d for the full induction period.

Adipogenic differentiation

Confluent cells were cultured in adipogenic medium with DMEM supplemented with 10% FBS, 1% P/S, 0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine (Sigma-Aldrich), 1 μ M dexamethasone (Sigma-Aldrich), 200 μ M indomethacin (Sigma-

Aldrich) and 1.7 μ M insulin (Sigma-Aldrich) (23). Culture medium was changed every 2–3 d for 21 d. Differentiated cells were detected with Herxheimer staining for identifying intracellular lipid accumulation and by examining the expression of the adipocyte cell markers LPL and FABP4 using real-time PCR.

EC differentiation

Cells were cultured with EC differentiated medium [M-199 supplemented with 3% FBS, 1% P/S (Life Technologies), 10 ng/ μ l fibroblast growth factor (BD Biosciences), and 50 ng/ μ l VEGF (Sigma-Aldrich)] for 7 d. Subsequent differentiation was evaluated by cord formation on plating on Matrigel (BD Biosciences; ref. 24) and by examining expression of the EC markers PECAM-1, VEGFR2, VEGFR1, and vWF by PCR.

Statistical analyses

Statistical analyses were performed using StatView software. Data are expressed as means \pm SE. Statistical significance was assessed by unpaired Student’s *t* test. Values of *P* < 0.05 were considered statistically significant. Correlation significances were determined as linear correlations.

RESULTS

Patient data

The clinical characteristics of the subjects are detailed in **Table 1**. For analytical purposes, subjects were grouped by BMI. As such, morbidly obese patients (*n*=16) presented a BMI > 40 kg/m² (44.44 \pm 1.29 kg/m²) whereas nonobese individuals (*n*=8) presented a BMI < 25 kg/m² (22.26 \pm 0.88 kg/m²). Morbidly obese patients had hyperglycemia (142.13 \pm 11.95 mg/dl glucose; *P*<0.05) and lower levels of HDL cholesterol and total cholesterol/HDL ratio than nono-

TABLE 1. Clinical characteristics of the subjects who participate in the study

Characteristic	Morbidly obese patients	Nonobese individuals	<i>P</i>
<i>n</i>	16	8	
Age	41.56 \pm 3.07	38.28 \pm 2.48	NS
BMI (kg/m ²)	44.44 \pm 1.29	22.26 \pm 0.88	<0.0001
Biochemical parameter			
Glucose (mg/dl)	142.13 \pm 11.95	61.54 \pm 7.35	0.0003
Triglyceride (mg/dl)	135.00 \pm 18.41	131.14 \pm 40.72	NS
Cholesterol (mg/dl)	184.19 \pm 10.58	186.71 \pm 9.41	NS
HDL (mg/dl)	33.20 \pm 3.05	48.32 \pm 2.82	0.0045
LDL (mg/dl)	133.33 \pm 12.97	157.43 \pm 11.33	NS
Urea (mg/dl)	23.61 \pm 1.90	29.03 \pm 2.71	NS
Total protein (g/dl)	7.16 \pm 0.31	7.03 \pm 0.35	NS
GOT (U/L)	17.78 \pm 2.98	32.50 \pm 14.58	NS
GPT (U/L)	19.32 \pm 4.67	33.72 \pm 16.54	NS
GPT/GOT	1.15 \pm 0.11	0.94 \pm 0.14	NS
Creatinine (mg/dl)	0.83 \pm 0.07	0.55 \pm 0.10	0.036
Cholesterol/HDL	5.92 \pm 0.48	3.98 \pm 0.38	0.01
HDL/LDL	0.25 \pm 0.03	0.31 \pm 0.02	NS

Data are presented as the means \pm SE. GOT, glutamic oxaloacetic transaminase; GPT, glutamic pyruvic transaminase; NS, not significant.

TABLE 2. Phenotypic characterization of human subcutaneous stromal vascular fraction

Antigen	Nonobese individuals	Morbidly obese patients	P
CD90 ⁺ (%)	35.31 ± 7.70	19.11 ± 3.07	<0.05
CD29 ⁺ (%)	32.16 ± 8.94	34.82 ± 6.99	NS
CD44 ⁺ (%)	9.05 ± 5.91	6.49 ± 1.32	NS
CD45 ⁺ (%)	14.40 ± 5.30	7.47 ± 1.81	NS

Percentages of ADSC surface markers were analyzed in the subcutaneous stromal vascular fraction from nonobese individuals and morbidly obese patients. Data are presented as means ± SE; NS, not significant.

bese individuals ($P < 0.05$), supporting their metabolic syndrome condition.

SVF and ADSC phenotypic characterization

We analyzed the presence of ADSC surface markers (CD90, CD29, and CD44) in the subcutaneous SVF from WAT of morbidly obese and nonobese subjects. CD45 was used as a marker of hematopoietic cells (Table 2). Flow cytometry results revealed the presence of higher numbers of CD90⁺ cells in WAT from nonobese individuals (35.31±7.7%) than in WAT of morbidly obese patients (19.11±3.07%). No differences between groups were seen when we analyzed CD29⁺ (nonobese: 32.16±8.94%; morbidly obese: 34.82±6.99%) and CD44⁺ (nonobese: 9.05±5.91%; morbidly obese: 6.49±1.32%) cells.

ADSCns and ADSCmos were harvested and cultured in two different oxygen conditions: normoxia (21% O₂) and hypoxia (1% O₂). After *in vitro* culture (passage 3) we measured the presence of CD90, CD29, CD44, CD105, CD34, and CD45 in the cultured cells. The percentages of CD90⁺, CD29⁺, CD44⁺, and CD105⁺ cells achieved 90–100% in both groups of subjects regardless of oxygen culture conditions (Table 3). No CD45⁺ or CD34⁺ cells were observed in the cultured cells.

Growth kinetics of cultured ADSCs under normoxic and hypoxic conditions

To evaluate the effects of oxygen concentration on ADSCn and ADSCmo growth, we analyzed the effect of

both normoxic and hypoxic conditions (Fig. 1A) in growth kinetics up to 10 d.

When ADSC numbers were monitored over time, an exponential cell growth curve was obtained (Fig. 1B, C). When comparing ADSC growth curves in both oxygen conditions, ADSCs cultured in hypoxic conditions showed faster growth kinetics than ADSCs cultured in normoxic conditions ($P < 0.05$). This significant effect was shown in both ADSCns (Fig. 1B) and ADSCmos (Fig. 1C). The lag phase before cell growth was longer in ADSCns than in ADSCmos in both oxygen conditions, but the differences did not reach statistical significance (Fig. 1D).

PDT was calculated from the exponential-growth phase of the growth curves. PDT was longer in ADSCmos than in ADSCns cultured in normoxic conditions (ADSCmos: 3.20±0.06 d, ADSCns: 2.38±0.21 d; $P < 0.05$; Fig. 1E) and in hypoxic conditions (ADSCmos: 2.66±0.085 d, ADSCns: 1.88±0.055 d; $P < 0.0005$; Fig. 1F). Indeed, ADSCs from subcutaneous WAT of obese patients were significantly less proliferative than ADSCs from subcutaneous WAT of nonobese individuals.

Angiogenic potential

To study the angiogenic potential of ADSCns and ADSCmos, we measured the gene and protein expression levels of the antiangiogenic molecule TSP-1. ADSCmos presented higher expression levels of TSP-1 as both mRNA [ADSCns: 556.15±284.16 arbitrary units (AU), ADSCmos: 2017.96±324.88 AU; $P = 0.016$; Fig. 2A] and protein (ADSCns: 0.13±0.05 AU, ADSCmos: 0.98±0.22 AU; $P = 0.0024$; Fig. 2B). These values correlate with BMI (mRNA: $R^2 = 0.44$, $P = 0.0037$; protein: $R^2 = 0.49$, $P = 0.0025$). TSP-1 secreted levels (Fig. 2C) were higher in ADSCmo than ADSCn conditioned medium (ADSCn: 71.78±12.56 ng TSP-1/mg total protein, ADSCmo: 121.06±12.2 ng TSP-1/mg total protein). When we analyzed the effect of the conditioned medium from ADSCmos and ADSCns on the capillary-like tube formation capacity of HUVECs in Matrigel (Fig. 2D), we found that conditioned medium from ADSCmos induced a significantly reduced formation of capillary-like structures (ADSCns: 9813.31±1086.65 AU, ADSCmos: 7387.78±518.34 AU; $P = 0.035$; Fig. 2D).

TABLE 3. Phenotypic characterization of human ADSCs

Antigen	Normoxic conditions		Hypoxic conditions		P
	ADSCn	ADSCmo	ADSCn	ADSCmo	
CD90 ⁺ (%)	96.79 ± 1.86	98.7 ± 0.67	98.29 ± 1.45	99.80 ± 0.11	NS
CD29 ⁺ (%)	99.33 ± 1.34	99.60 ± 0.50	96.60 ± 1.90	93.05 ± 5.36	NS
CD44 ⁺ (%)	95.73 ± 1.49	98.40 ± 1.30	95.97 ± 7.50	91.00 ± 7.13	NS
CD105 ⁺ (%)	92.6 ± 1.5	93.7 ± 0.7	91.2 ± 2.1	94 ± 0.9	NS
CD34 ⁺ (%)	0.3 ± 0.1	0.1 ± 0.1	0.6 ± 0.3	0.1 ± 0.1	NS
CD45 ⁺ (%)	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	NS

ADSC surface markers were analyzed in ADSCns and ADSCmos cultured after 3 passages under normoxia (21% O₂) or hypoxia (1% O₂) conditions. Data are presented as means ± SE. NS, not significant.

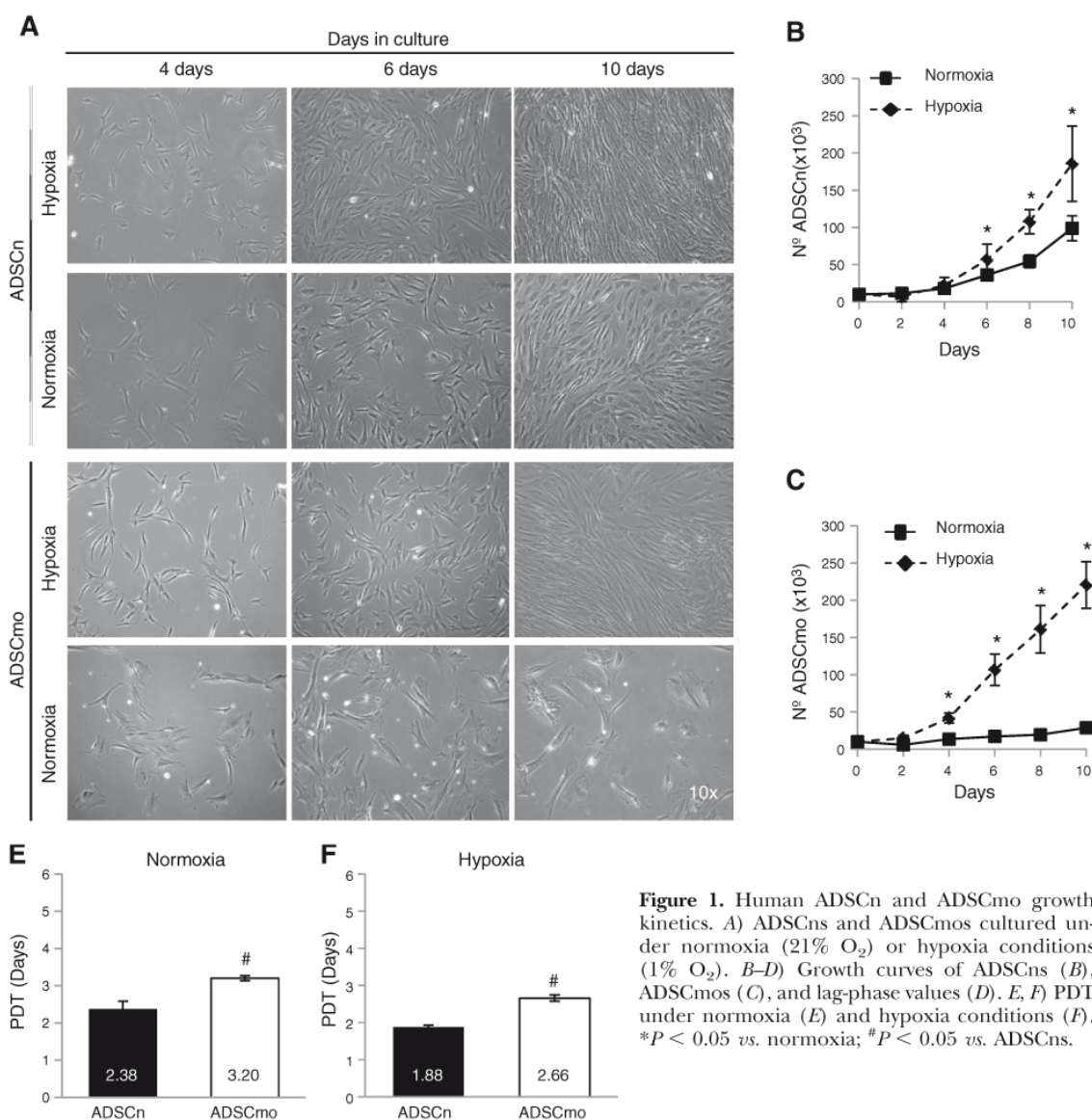


Figure 1. Human ADSCn and ADSCmo growth kinetics. A) ADSCns and ADSCmos cultured under normoxia (21% O₂) or hypoxia conditions (1% O₂). B–D) Growth curves of ADSCns (B), ADSCmos (C), and lag-phase values (D). E, F) PDT under normoxia (E) and hypoxia conditions (F). **P* < 0.05 vs. normoxia; #*P* < 0.05 vs. ADSCns.

Adipogenic differentiation capacity

To evaluate the potential of ADSCns and ADSCmos to differentiate, cells cultured in hypoxic conditions were induced to differentiate to adipocytes (Fig. 3). Both cell types showed adipocyte differentiation; however, ADSCns showed larger-size lipid vesicles positive for Herxheimer’s staining (Fig. 3A). Moreover, differentiated ADSCns showed a significantly higher expression of the adipocyte cell markers FABP4 (ADSCns: 22,400-fold, ADSCmos: 4300-fold) and LPL (ADSCns: 30,000-fold, ADSCmos: 1700-fold; Fig. 3B).

EC differentiation capacity

ADSCns and ADSCmos showed EC differentiation (Fig. 4). While undifferentiated ADSCns and ADSCmos

did not form capillary-like ring structures in Matrigel (Fig. 4A), EC-differentiated ADSCs formed capillary-like networks. These networks were of similar lengths for both EC-differentiated ADSCs (ADSCns: 6264.81±1454.23 AU, ADSCmos: 7040.72±1234.94 AU; Fig. 4B).

The expression of EC molecular markers in differentiated and undifferentiated ADSCns and ADSCmos (Fig. 5) showed some differences. ADSCns and ADSCmos significantly increased the expression of PECAM-1 after EC differentiation (ADSCns: 17-fold, *P*=0.03; ADSCmos: 12-fold, *P*=0.0028). Expression levels of VEGFR1 were not modified after EC differentiation, although a nonsignificantly higher expression was seen in ADSCmos before and after differentiation. VEGFR2, CD34, and vWF had very low expression levels regardless of cell type and the differentiation process in these cells.

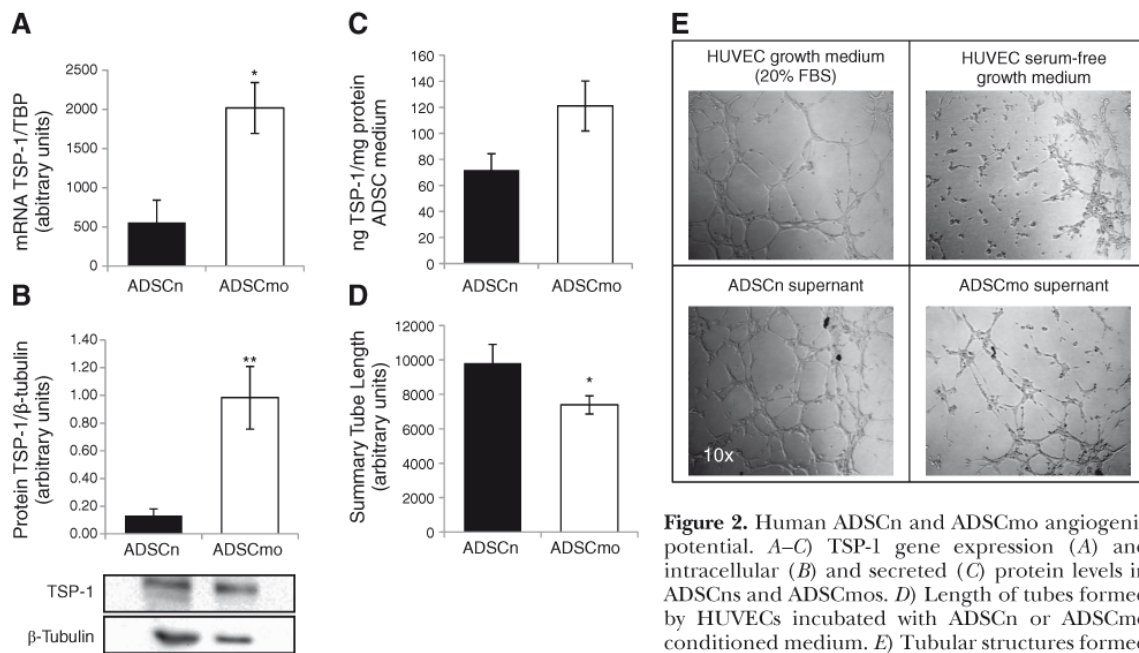


Figure 2. Human ADSCn and ADSCmo angiogenic potential. A–C) TSP-1 gene expression (A) and intracellular (B) and secreted (C) protein levels in ADSCns and ADSCmos. D) Length of tubes formed by HUVECs incubated with ADSCn or ADSCmo conditioned medium. E) Tubular structures formed by HUVECs. * $P < 0.05$, ** $P < 0.005$.

DISCUSSION

ADSCs have recently become an alternative source of pluripotent stem cells for cell therapy. Certainly, ADSCs have been used in various preclinical models and clinical trials. However, previous studies using circulating progenitor cells from patients with cardiovascular risk factors have shown impaired properties. As such, evidence suggests that smoking, hypertension, coronary artery disease, diabetes, and hypercholesterolemia reduce the number and functional activities of isolated endothelial progenitor cells. Endothelial progenitor cell proliferation, migration, adhesion, and *in vitro* vasculogenesis are impaired in patients with cardiovascular risk factors (14, 17–21, 25, 26). As to ADSCs, age, adipose tissue depot site, and

gender have the potential to modify the functionality and quality of ADSCs (9–13). However, little is known about the effect of obesity in endogenous ADSCs. In the present study, we compared subcutaneous ADSCs from morbidly obese patients and from nonobese individuals, analyzing growth behavior, differentiation capacity, and angiogenic potential.

We observed that WAT from morbidly obese patients presented a lower percentage of CD90⁺ cells within the SVF. This result is in agreement with a study reporting reduced committed preadipocyte numbers in obese patients (27). However, the percentages of CD29⁺ and CD44⁺ cells were similar in SVFs from both morbidly obese and nonobese subjects.

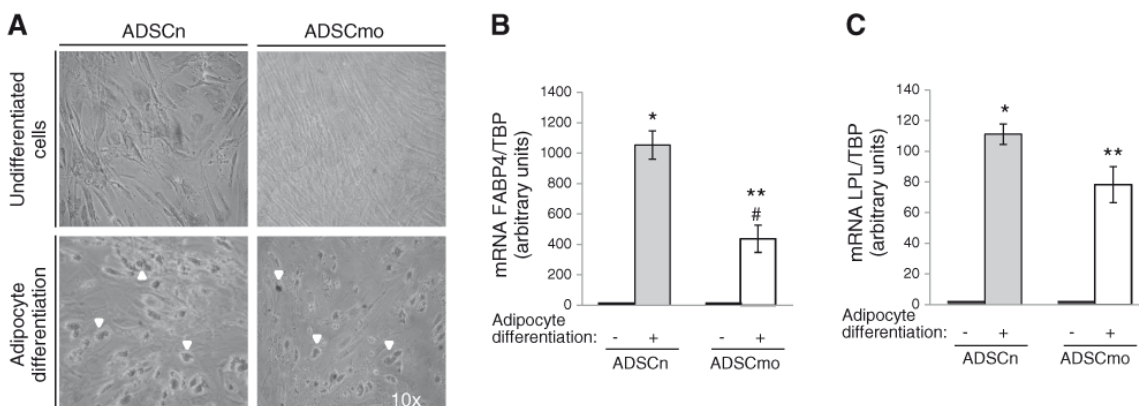


Figure 3. Differentiation of human ADSCns and ADSCmos toward adipogenic phenotype. Adipogenic differentiation of ADSCns and ADSCmos was detected by Herxheimer staining of lipids (A, arrowheads) and the expression of adipocyte molecular markers FABP4 (B) and LPL (C). * $P < 0.005$, ** $P < 0.0005$ vs. undifferentiated cells; # $P < 0.005$ vs. ADSCns.

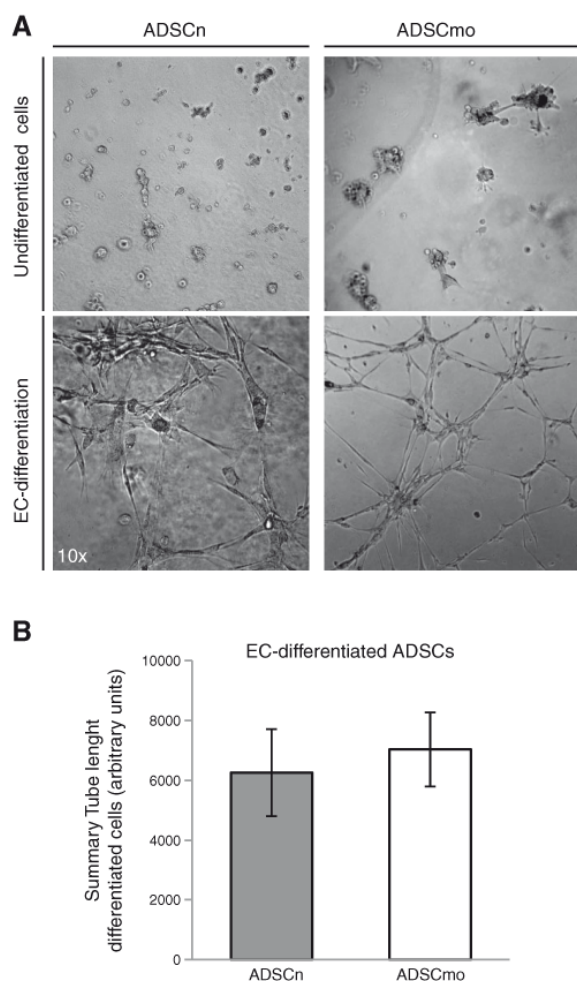


Figure 4. Differentiation of human ADSCNs and ADSCmos toward ECs. *A*) Acquisition of EC phenotype of differentiated ADSCNs and ADSCmos was evaluated by formation of capillary-like ring-structures when plating cells onto Matrigel. *B*) Total length of the formed tubes of EC-differentiated ADSCs was quantified.

For clinical cell therapy purposes, it would be beneficial to obtain the most ADSCs in the shortest period of time. Hypoxia is an important microenvironmental factor in major aspects of stem cell biology, including survival, proliferation viability, pluripotency maintenance, differentiation, and migration (28–32). Despite the fact that the anatomical sites of MSC niches in the body are relatively oxygen deficient, MSCs are usually cultured under normoxic conditions. Although hypoxia, concomitant with serum deprivation, has been demonstrated to induce apoptosis in MSCs (33, 34), culturing MSCs under physiologically relevant low-oxygen-tension conditions may uniquely benefit the proliferation, differentiation, growth factor secretion, and migration/homing potential of transplanted cells. Previous studies have demonstrated that culturing BM-MSCs and human ADSCs under hypoxic conditions

increased their proliferation capacity (30, 35, 36), although those cells presented an extended lag phase in order to acclimatize to culture conditions (29). Moreover, it has been shown that hypoxia increases angiogenic potential and the release of paracrine factors in murine and human BM-MSCs and ADSCs (35, 37–39). Indeed, the tissue-regenerative potential of BM-MSCs in the repair of murine infarcted myocardium and hindlimb ischemia (32, 37) and MSC wound-healing effects (36, 40) has been improved by hypoxic preconditioning. Therefore, we cultured ADSCNs and ADSCmos under two different oxygen conditions (normoxia and hypoxia) in order to compare growth kinetics and function between ADSCmo and ADSCn. Firstly, when we cultured ADSCs under normoxic conditions, both ADSCNs and ADSCmos were 90–100% positive for CD90, CD29, CD105, and CD44. ADSCs cultured under hypoxic conditions elicited similar results in surface marker expression of pluripotency. These results showed that neither hypoxia nor obesity modifies the molecular phenotype of expanded ADSCs.

However, we tested the effects of cell culture oxygen levels on cellular function. Hypoxia seems to modify ADSC proliferation. We observed an improvement in growth kinetics of ADSCNs and ADSCmos cultured under hypoxic conditions. Interestingly, ADSCs from obese patients showed decreased proliferation capacity. ADSCmos presented slower PDTs than ADSCNs cultured under both normoxic and hypoxic conditions.

In previous experimental animal studies with mice, rats, and rabbits, ADSCs were shown to have angiogenic properties through the release of paracrine factors (4–6). In fact, ADSCs are known to secrete a large number of angiogenic factors, including VEGF, hepatocyte growth factor, insulin-like growth factor 1, transforming growth factor- β , and monocyte chemoattractant protein 1, among many others, which suggests an active role of ADSCs in promoting revascularization of the ischemic tissue (41–44).

To this end, we studied whether ADSCmos had a different angiogenic potential. We measured levels of TSP-1 at the gene expression and intracellular and secreted-protein levels. TSP-1 is an adipokine with antiangiogenic effects, the expression and secretion of which have been shown to be strongly modulated by insulin and glucose levels in adipocytes from rats with diet-induced obesity (45) and the degree of obesity in human adipose tissue from extremely obese and insulin-resistant subjects (46, 47). In all cases, TSP-1 levels were higher in ADSCmos than in ADSCNs. Conditioned medium from ADSCmos induced a decrease in HUVEC capillary-like ring formation with respect to ADSCn conditioned medium, indicating a much lower proangiogenic capacity of ADSCmos.

To study how obesity may affect ADSC differentiation capacity, we induced differentiation of ADSCNs and ADSCmos toward both adipocytes and ECs (24, 48). Several studies have shown an inverse correlation between BMI and preadipocyte differentiation capacity. In women, obesity reduces the differentiation capacity

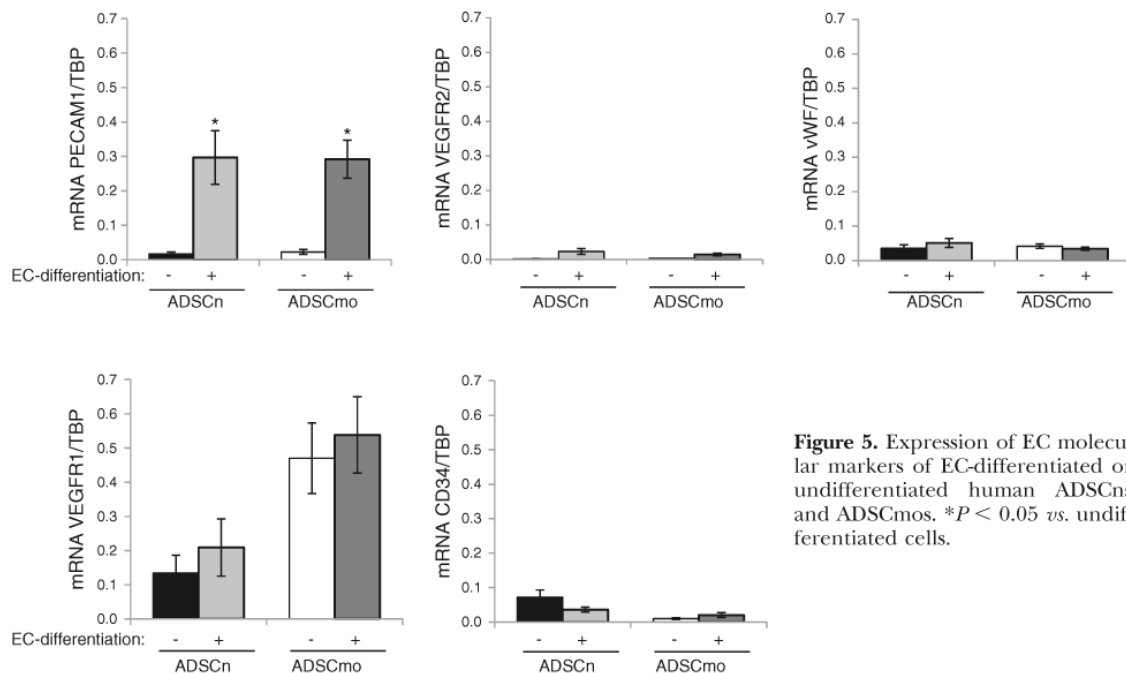


Figure 5. Expression of EC molecular markers of EC-differentiated or undifferentiated human ADSCns and ADSCmos. * $P < 0.05$ vs. undifferentiated cells.

of the adipose SVF (10, 27), and in Pima Indians, preadipocyte differentiation correlated negatively with the degree of central obesity (49). Impaired adipocyte differentiation of preadipocytes in obesity has also been reported (50). Here we found that ADSCmos showed lower differentiation capacity to adipocytes than ADSCns. Although the expression of the adipocyte-specific genes LPL and FABP4 increased after the differentiation process, ADSCmos presented lower expression levels compared to ADSCns.

ADSC differentiation to ECs also showed differences between both cells. Indeed, the expression of EC-specific genes did not follow the same pattern in ADSCmos and ADSCns. ADSCmos expressed higher levels of VEGFR1 than ADSCns before and after EC-differentiation. Only *in vitro* differentiated ADSCs presented the ability to form capillary-like ring structures. EC differentiation similarly modified the expression of PECAM-1, while VEGFR2, CD34, and vWF expression levels were almost undetectable in both cell types and did not change their expression after the differentiation process.

In summary, ADSCs from morbidly obese patients with metabolic syndrome show impairment in proliferation, angiogenic capacity, and differentiation potential. These effects may negatively influence their regenerative potential when used in cell therapy and also in spontaneous repair of minor organ damage. Indeed, ADSCs have already been tested in several clinical trials, from repair of heart ischemic injury to Crohn's disease and multiple sclerosis (51–55). However, our observations indicate that the therapeutic strategies based on autologous ADSC implantation would be impaired in patients with obesity and metabolic syndrome. **FJ**

This work was supported by grants SAF2010/16549, CIBERobn-CB06/03, and Retic-TERCEL RD06/0010/0017 from Instituto Salud Carlos III (Madrid, Spain) and Fundación Jesús Serra (Barcelona, Spain). L.B. is the Cardiovascular Research Chair, Universitat Autònoma de Barcelona (Barcelona, Spain). B.O. was the recipient of a predoctoral fellowship from Instituto Salud Carlos III. G.V. is a recipient of a contract from the Spanish Ministry of Science and Innovation (MICINN; RyC-2009-5495). R.F.-L. is a recipient of a Sara Borrell contract from Instituto Salud Carlos III, MICINN. The authors thank Marta Sánchez and Vanesa Rodríguez for their technical support. The authors declare no conflicts of interest.

REFERENCES

- Zuk, P. A., Zhu, M., Mizuno, H., Huang, J., Futrell, J. W., Katz, A. J., Benhaim, P., Lorenz, H. P., and Hedrick, M. H. (2001) Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng.* **7**, 211–228
- Kern, S., Eichler, H., Stoeve, J., Kluter, H., and Bieback, K. (2006) Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells* **24**, 1294–1301
- Zuk, P. A., Zhu, M., Ashjian, P., De Ugarte, D. A., Huang, J. L., Mizuno, H., Alfonso, Z. C., Fraser, J. K., Benhaim, P., and Hedrick, M. H. (2002) Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol. Biol. Cell* **13**, 4279–4295
- Kim, J. H., Jung, M., Kim, H. S., Kim, Y. M., and Choi, E. H. (2011) Adipose-derived stem cells as a new therapeutic modality for ageing skin. *Exp. Dermatol.* **20**, 383–387
- Zhang, D. Z., Gai, L. Y., Liu, H. W., Jin, Q. H., Huang, J. H., and Zhu, X. Y. (2007) Transplantation of autologous adipose-derived stem cells ameliorates cardiac function in rabbits with myocardial infarction. *Chin. Med. J. (Engl.)* **120**, 300–307
- Sheng, L., Yang, M., Li, H., Du, Z., Yang, Y., and Li, Q. (2011) Transplantation of adipose stromal cells promotes neovascularization of random skin flaps. *Tohoku. J. Exp. Med.* **224**, 229–234
- Gonzalez-Rey, E., Gonzalez, M. A., Varela, N., O'Valle, F., Hernandez-Cortes, P., Rico, L., Buscher, D., and Delgado, M.

- (2010) Human adipose-derived mesenchymal stem cells reduce inflammatory and T cell responses and induce regulatory T cells in vitro in rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* **69**, 241–248
8. Constantin, G., Marconi, S., Rossi, B., Angiari, S., Calderan, L., Anghileri, E., Gini, B., Bach, S. D., Martinello, M., Bifari, F., Galic, M., Turano, E., Budui, S., Sbarbati, A., Krampera, M., and Bonetti, B. (2009) Adipose-derived mesenchymal stem cells ameliorate chronic experimental autoimmune encephalomyelitis. *Stem Cells* **27**, 2624–2635
 9. Madonna, R., Renna, F. V., Cellini, C., Cotellese, R., Picardi, N., Francomano, F., Innocenti, P., and De Caterina, R. (2011) Age-dependent impairment of number and angiogenic potential of adipose tissue-derived progenitor cells. *Eur. J. Clin. Invest.* **41**, 126–133
 10. Van Harmelen, V., Skurk, T., Rohrig, K., Lee, Y. M., Halbleib, M., Aprath-Husmann, I., and Hauner, H. (2003) Effect of BMI and age on adipose tissue cellularity and differentiation capacity in women. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* **27**, 889–895
 11. Zhu, M., Kohan, E., Bradley, J., Hedrick, M., Benhaim, P., and Zuk, P. (2009) The effect of age on osteogenic, adipogenic and proliferative potential of female adipose-derived stem cells. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **3**, 290–301
 12. Efimenko, A., Starostina, E., Kalinina, N., and Stolzing, A. (2011) Angiogenic properties of aged adipose derived mesenchymal stem cells after hypoxic conditioning. *J. Transl. Med.* **9**, 10
 13. Schipper, B. M., Marra, K. G., Zhang, W., Donnenberg, A. D., and Rubin, J. P. (2008) Regional anatomic and age effects on cell function of human adipose-derived stem cells. *Ann. Plast. Surg.* **60**, 538–544
 14. Chen, J. Z., Zhang, F. R., Tao, Q. M., Wang, X. X., and Zhu, J. H. (2004) Number and activity of endothelial progenitor cells from peripheral blood in patients with hypercholesterolaemia. *Clin. Sci. (Lond.)* **107**, 273–280
 15. Hill, J. M., Zalos, G., Halcox, J. P., Schenke, W. H., Waclawiw, M. A., Quyyumi, A. A., and Finkel, T. (2003) Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *N. Engl. J. Med.* **348**, 593–600
 16. Loomans, C. J., de Koning, E. J., Staal, F. J., Rookmaaker, M. B., Verseyden, C., de Boer, H. C., Verhaar, M. C., Braam, B., Rabelink, T. J., and van Zonneveld, A. J. (2004) Endothelial progenitor cell dysfunction: a novel concept in the pathogenesis of vascular complications of type 1 diabetes. *Diabetes* **53**, 195–199
 17. Tamarat, R., Silvestre, J. S., Le Ricousse-Roussanne, S., Barateau, V., Lecomte-Raclet, L., Clergue, M., Duriez, M., Tobelem, G., and Levy, B. I. (2004) Impairment in ischemia-induced neovascularization in diabetes: bone marrow mononuclear cell dysfunction and therapeutic potential of placenta growth factor treatment. *Am. J. Pathol.* **164**, 457–466
 18. Tepper, O. M., Galiano, R. D., Capla, J. M., Kalka, C., Gagne, P. J., Jacobowitz, G. R., Levine, J. P., and Gurtner, G. C. (2002) Human endothelial progenitor cells from type II diabetics exhibit impaired proliferation, adhesion, and incorporation into vascular structures. *Circulation* **106**, 2781–2786
 19. Vasa, M., Fichtlscherer, S., Aicher, A., Adler, K., Urbich, C., Martin, H., Zeiher, A. M., and Dimmeler, S. (2001) Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease. *Circ. Res.* **89**, E1–E7
 20. Ramunni, A., Brescia, P., Dambra, P., Capuzzimati, L., Ria, R., De Tullio, G., Resta, F., Russi, G., Vacca, A., and Coratelli, P. (2010) Effect of low-density lipoprotein apheresis on circulating endothelial progenitor cells in familial hypercholesterolemia. *Blood Purif.* **29**, 383–389
 21. Yang, Z., Chen, L., Su, C., Xia, W. H., Wang, Y., Wang, J. M., Chen, F., Zhang, Y. Y., Wu, F., Xu, S. Y., Zhang, X. L., and Tao, J. (2010) Impaired endothelial progenitor cell activity is associated with reduced arterial elasticity in patients with essential hypertension. *Clin. Exp. Hypertens.* **32**, 444–452
 22. Jurgens, W. J., Oedayrajsingh-Varma, M. J., Helder, M. N., Zandiehoulabi, B., Schouten, T. E., Kuik, D. J., Ritt, M. J., and van Milligen, F. J. (2008) Effect of tissue-harvesting site on yield of stem cells derived from adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Cell Tissue Res.* **332**, 415–426
 23. Gupta, V., Bhasin, S., Guo, W., Singh, R., Miki, R., Chauhan, P., Choong, K., Tchkonja, T., Lebrasseur, N. K., Flanagan, J. N., Hamilton, J. A., Viereck, J. C., Narula, N. S., Kirkland, J. L., and Jasuja, R. (2008) Effects of dihydrotestosterone on differentiation and proliferation of human mesenchymal stem cells and preadipocytes. *Mol. Cell. Endocrinol.* **296**, 32–40
 24. Fischer, L. J., McIlhenny, S., Tulenko, T., Golesorkhi, N., Zhang, P., Larson, R., Lombardi, J., Shapiro, L., and DiMuzio, P. J. (2009) Endothelial differentiation of adipose-derived stem cells: effects of endothelial cell growth supplement and shear force. *J. Surg. Res.* **152**, 157–166
 25. Yue, W. S., Wang, M., Yan, G. H., Yiu, K. H., Yin, L., Lee, S. W., Siu, C. W., and Tse, H. F. (2010) Smoking is associated with depletion of circulating endothelial progenitor cells and elevated pulmonary artery systolic pressure in patients with coronary artery disease. *Am. J. Cardiol.* **106**, 1248–1254
 26. Heida, N. M., Muller, J. P., Cheng, I. F., Leifheit-Nestler, M., Faustini, V., Riggert, J., Hasenfuss, G., Konstantinides, S., and Schafer, K. (2010) Effects of obesity and weight loss on the functional properties of early outgrowth endothelial progenitor cells. *J. Am. Coll. Cardiol.* **55**, 357–367
 27. Tchoukalova, Y., Koutsari, C., and Jensen, M. (2007) Committed subcutaneous preadipocytes are reduced in human obesity. *Diabetologia* **50**, 151–157
 28. Ezashi, T., Das, P., and Roberts, R. M. (2005) Low O₂ tensions and the prevention of differentiation of hES cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 4783–4788
 29. Grayson, W. L., Zhao, F., Izadpanah, R., Bunnell, B., and Ma, T. (2006) Effects of hypoxia on human mesenchymal stem cell expansion and plasticity in 3D constructs. *J. Cell. Physiol.* **207**, 331–339
 30. Grayson, W. L., Zhao, F., Bunnell, B., and Ma, T. (2007) Hypoxia enhances proliferation and tissue formation of human mesenchymal stem cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **358**, 948–953
 31. Potier, E., Ferreira, E., Andriamanalijaona, R., Pujol, J. P., Oudina, K., Logeart-Avramoglou, D., and Petite, H. (2007) Hypoxia affects mesenchymal stromal cell osteogenic differentiation and angiogenic factor expression. *Bone* **40**, 1078–1087
 32. Rosova, I., Dao, M., Capoccia, B., Link, D., and Nolta, J. A. (2008) Hypoxic preconditioning results in increased motility and improved therapeutic potential of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells* **26**, 2173–2182
 33. Zhu, W., Chen, J., Cong, X., Hu, S., and Chen, X. (2006) Hypoxia and serum deprivation-induced apoptosis in mesenchymal stem cells. *Stem Cells* **24**, 416–425
 34. Potier, E., Ferreira, E., Meunier, A., Sedel, L., Logeart-Avramoglou, D., and Petite, H. (2007) Prolonged hypoxia concomitant with serum deprivation induces massive human mesenchymal stem cell death. *Tissue Eng.* **13**, 1325–1331
 35. Pilgaard, L., Lund, P., Duroux, M., Lockstone, H., Taylor, J., Emmersen, J., Fink, T., Ragoussis, J., and Zachar, V. (2009) Transcriptional signature of human adipose tissue-derived stem cells (hASCs) preconditioned for chondrogenesis in hypoxic conditions. *Exp. Cell Res.* **315**, 1937–1952
 36. Lee, E. Y., Xia, Y., Kim, W. S., Kim, M. H., Kim, T. H., Kim, K. J., Park, B. S., and Sung, J. H. (2009) Hypoxia-enhanced wound-healing function of adipose-derived stem cells: increase in stem cell proliferation and up-regulation of VEGF and bFGF. *Wound Repair Regen.* **17**, 540–547
 37. Hu, X., Yu, S. P., Fraser, J. L., Lu, Z., Ogle, M. E., Wang, J. A., and Wei, L. (2008) Transplantation of hypoxia-preconditioned mesenchymal stem cells improves infarcted heart function via enhanced survival of implanted cells and angiogenesis. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **135**, 799–808
 38. Rasmussen, J. G., Frobert, O., Pilgaard, L., Kastrup, J., Simonsen, U., Zachar, V., and Fink, T. (2010) Prolonged hypoxic culture and trypsinization increase the pro-angiogenic potential of human adipose tissue-derived stem cells. *Cytotherapy* **13**, 318–328
 39. Thangarajah, H., Vial, I. N., Chang, E., El-Ftesi, S., Januszzyk, M., Chang, E. I., Paterno, J., Neofytou, E., Longaker, M. T., and Gurtner, G. C. (2009) IFATS collection: Adipose stromal cells adopt a proangiogenic phenotype under the influence of hypoxia. *Stem Cells* **27**, 266–274
 40. Wu, Y., Chen, L., Scott, P. G., and Tredget, E. E. (2007) Mesenchymal stem cells enhance wound healing through differentiation and angiogenesis. *Stem Cells* **25**, 2648–2659
 41. Gneocchi, M., He, H., Liang, O. D., Melo, L. G., Morello, F., Mu, H., Noiseux, N., Zhang, L., Pratt, R. E., Ingwall, J. S., and Dzau,

- V. J. (2005) Paracrine action accounts for marked protection of ischemic heart by Akt-modified mesenchymal stem cells. *Nat. Med.* **11**, 367–368
42. Rehman, J., Traktuev, D., Li, J., Merfeld-Clauss, S., Temm-Grove, C. J., Bovenkerk, J. E., Pell, C. L., Johnstone, B. H., Conside, R. V., and March, K. L. (2004) Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. *Circulation* **109**, 1292–1298
 43. Wang, M., Crisostomo, P. R., Herring, C., Meldrum, K. K., and Meldrum, D. R. (2006) Human progenitor cells from bone marrow or adipose tissue produce VEGF, HGF, and IGF-I in response to TNF by a p38 MAPK-dependent mechanism. *Am. J. Physiol.* **291**, R880–884
 44. Nakagami, H., Maeda, K., Morishita, R., Iguchi, S., Nishikawa, T., Takami, Y., Kikuchi, Y., Saito, Y., Tamai, K., Ogihara, T., and Kaneda, Y. (2005) Novel autologous cell therapy in ischemic limb disease through growth factor secretion by cultured adipose tissue-derived stromal cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **25**, 2542–2547
 45. Garcia-Diaz, D. F., Arellano, A. V., Milagro, F. I., Moreno-Aliaga, M. J., Portillo, M. P., Martinez, J. A., and Campion, J. (2011) Glucose and insulin modify thrombospondin 1 expression and secretion in primary adipocytes from diet-induced obese rats. *J. Physiol. Biochem.* **67**, 453–461
 46. Ramis, J. M., Franssen-van Hal, N. L., Kramer, E., Llado, I., Bouillaud, F., Palou, A., and Keijer, J. (2002) Carboxypeptidase E and thrombospondin-1 are differently expressed in subcutaneous and visceral fat of obese subjects. *Cell. Mol. Life Sci.* **59**, 1960–1971
 47. Varma, V., Yao-Borengasser, A., Bodles, A. M., Rasouli, N., Phanavanh, B., Nolen, G. T., Kern, E. M., Nagarajan, R., Spencer, H. J., 3rd, Lee, M. J., Fried, S. K., McGehee, R. E., Jr., Peterson, C. A., and Kern, P. A. (2008) Thrombospondin-1 is an adipokine associated with obesity, adipose inflammation, and insulin resistance. *Diabetes* **57**, 432–439
 48. Planat-Benard, V., Silvestre, J. S., Cousin, B., Andre, M., Nibelink, M., Tamarat, R., Clergue, M., Manneville, C., Saillan-Barreau, C., Duriez, M., Tedgui, A., Levy, B., Penicaud, L., and Casteilla, L. (2004) Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives. *Circulation* **109**, 656–663
 49. Permana, P. A., Nair, S., Lee, Y. H., Luczy-Bachman, G., Vozarova De Courten, B., and Tataranni, P. A. (2004) Subcutaneous abdominal preadipocyte differentiation in vitro inversely correlates with central obesity. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **286**, E958–962
 50. Isakson, P., Hammarstedt, A., Gustafson, B., and Smith, U. (2009) Impaired preadipocyte differentiation in human abdominal obesity: role of Wnt, tumor necrosis factor- α , and inflammation. *Diabetes* **58**, 1550–1557
 51. Garcia-Olmo, D., Garcia-Arranz, M., Garcia, L. G., Cuellar, E. S., Blanco, I. F., Prianes, L. A., Montes, J. A., Pinto, F. L., Marcos, D. H., and Garcia-Sancho, L. (2003) Autologous stem cell transplantation for treatment of rectovaginal fistula in perianal Crohn's disease: a new cell-based therapy. *Int. J. Colorectal Dis.* **18**, 451–454
 52. Garcia-Olmo, D., Herreros, D., Pascual, I., Pascual, J. A., Del-Valle, E., Zorrilla, J., De-La-Quintana, P., Garcia-Arranz, M., and Pascual, M. (2009) Expanded adipose-derived stem cells for the treatment of complex perianal fistula: a phase II clinical trial. *Dis. Colon Rectum* **52**, 79–86
 53. Riordan, N. H., Ichim, T. E., Min, W. P., Wang, H., Solano, F., Lara, F., Alfaro, M., Rodriguez, J. P., Harman, R. J., Patel, A. N., Murphy, M. P., Lee, R. R., and Mineev, B. (2009) Non-expanded adipose stromal vascular fraction cell therapy for multiple sclerosis. *J. Transl. Med.* **7**, 29
 54. Casteilla, L., Planat-Benard, V., Cousin, B., Laharrague, P., and Bourin, P. (2009) Vascular and endothelial regeneration. *Curr. Stem Cell Res. Ther.* **5**, 141–144
 55. Casteilla, L., Planat-Benard, V., Dehez, S., De Barros, S., Barreau, C., and Andre, M. (2010) Endothelial and cardiac regeneration from adipose tissues. *Methods Mol. Biol.* **702**, 269–287

Received for publication March 5, 2012.

Accepted for publication June 20, 2012.

ARTÍCULO 2

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.

Blanca Oñate¹, Gemma Vilahur¹, Sandra Camino-López¹, Alberto Díez-Caballero², Carlos Ballesta-López³, Juan Ybarra⁴, Fabrizio Moscatiello⁵, Javier Herrero⁵, Lina Badimon¹

¹Cardiovascular Research Center, CSIC-ICCC, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, IIB-Sant Pau, Barcelona, Spain.

²Quirúrgica cirujanos Asociados, Centro Médico Teknon, Barcelona, Spain.

³C.L.B Centro laparoscópico Doctor Ballesta S.L.U, Barcelona, Spain.

⁴Resistencia a la Insulina SL., Barcelona, Spain.

⁵Department of Plastic Surgery, Centro Médico Teknon, Barcelona, Spain.

BMC Genomics, 2013 Sep 16;14(1):625.

Factor de Impacto: 4,40

RESUMEN

El tejido adiposo es un órgano endocrino que, cuando se acumula y produce obesidad, se convierte en un factor de riesgo para el desarrollo de la aterosclerosis y de la enfermedad cardiovascular. A pesar de que el tejido adiposo también es un reservorio de células madres (ASC), su función y su multipotencialidad han sido cuestionadas. Nuestra finalidad en este trabajo es la de estudiar los mecanismos por los cuales la obesidad afecta a las células madre derivadas del tejido adiposo subcutáneo.

Para llevar a cabo este estudio, realizamos análisis transcriptómicos *in silico*, y ensayos basados en la técnica de la PCR a tiempo real y de western-blot, en ASC aisladas de tejido adiposo subcutáneo abdominal derivadas de pacientes con obesidad mórbida (ASCmo) o de individuos no-obesos (ASCn).

Los análisis *in silico* revelaron que ambas poblaciones celulares presentaban un patrón de expresión génica diferencial y separado el uno del otro. Las ASCmo presentaban una disminución en la expresión de genes multipotenciales o implicados en el desarrollo, y un aumento de la expresión de genes implicados en la adipogénesis o en procesos inflamatorios, en comparación con las ASCn. Además, el análisis de datos via Ingenuity Pathway Analysis (IPA) mostró que el factor de

transcripción Smad3 podría estar afectado por la obesidad en las ASCmo. La validación de esta proteína nos confirmó que las ASCmo presentaban una reducción significativa de la translocación nuclear de Smad3.

El perfil transcriptómico de las células madre del tejido adiposo subcutáneo de pacientes obesos está altamente modificado con cambios importantes en los genes que regulan la multipotencialidad, la diferenciación a linajes específicos y la inflamación. A parte del índice de masa corporal, la acumulación de factores de riesgo cardiovascular afecta aún más al perfil transcriptómico de las ASC disminuyendo su multipotencialidad y su potencial de reparación tisular. En resumen, las células madre del tejido adiposo subcutáneo derivadas de pacientes obesos están comprometidas en el linaje adipocítico y muestran un aumento en la expresión de genes inflamatorios asociado con una pérdida de multipotencialidad.

RESEARCH ARTICLE

Open Access

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

Blanca Oñate¹, Gemma Vilahur¹, Sandra Camino-López¹, Alberto Díez-Caballero², Carlos Ballesta-López³, Juan Ybarra⁴, Fabrizio Moscattello⁵, Javier Herrero⁵ and Lina Badimon^{1*}

Abstract

Background: The adipose tissue is an endocrine regulator and a risk factor for atherosclerosis and cardiovascular disease when by excessive accumulation induces obesity. Although the adipose tissue is also a reservoir for stem cells (ASC) their function and “stemcellness” has been questioned. Our aim was to investigate the mechanisms by which obesity affects subcutaneous white adipose tissue (WAT) stem cells.

Results: Transcriptomics, in silico analysis, real-time polymerase chain reaction (PCR) and western blots were performed on isolated stem cells from subcutaneous abdominal WAT of morbidly obese patients (ASC_{mo}) and of non-obese individuals (ASC_n). ASC_{mo} and ASC_n gene expression clustered separately from each other. ASC_{mo} showed downregulation of “stemness” genes and upregulation of adipogenic and inflammatory genes with respect to ASC_n. Moreover, the application of bioinformatics and Ingenuity Pathway Analysis (IPA) showed that the transcription factor Smad3 was tentatively affected in obese ASC_{mo}. Validation of this target confirmed a significantly reduced Smad3 nuclear translocation in the isolated ASC_{mo}.

Conclusions: The transcriptomic profile of the stem cells reservoir in obese subcutaneous WAT is highly modified with significant changes in genes regulating stemcellness, lineage commitment and inflammation. In addition to body mass index, cardiovascular risk factor clustering further affect the ASC transcriptomic profile inducing loss of multipotency and, hence, capacity for tissue repair. In summary, the stem cells in the subcutaneous WAT niche of obese patients are already committed to adipocyte differentiation and show an upregulated inflammatory gene expression associated to their loss of stemcellness.

Keywords: Human adipose-derived stem cells, Subcutaneous adipose tissue, Cardiovascular risk factors, Transcriptome, Inflammatory genes

* Correspondence: lbadimon@csic-iccc.org

¹Cardiovascular Research Center, CSIC-ICCC, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, IIB-Sant Pau, Barcelona, Spain

Full list of author information is available at the end of the article

Background

White adipose tissue (WAT), traditionally viewed as an energy storage tissue, is now recognized as an endocrine organ that harvests and serves as repository of mesenchymal stem cells, the adipose-derived stem cells (ASC), for physiological cell renewal and spontaneous repair. Henceforth, these ASC have the potential to differentiate towards multiple tissue lineages, produce a large variety of growth factors and present immunomodulatory properties [1]. Mesenchymal stem cells (MSC) homing from bone marrow to peripheral tissue is probably the most specialized organ repairing process. During the last few years it has been possible to isolate MSC from different tissues [2].

Obesity, a chronic pathological condition, is a risk factor for cardiovascular disease, but paradoxically, it seems to protect against morbi/mortality from heart failure [3]. The hypothesis of a repository of stem cells in WAT of heart failure-obese patients that may serve as a source for spontaneous repair has never been tested. It has been recently suggested that any alteration of the stem cell homeostasis by constant and repetitive trauma, and chronic disease could provoke a persistent disequilibrium inside the stem cell reservoir leading to an irreversible and premature decrease of the stem cells regenerative potential reducing their "stemcellness" [2]. Because a growing body of evidence suggests that depot-specific variations in resident stem cells are retained despite in vitro culture processes [3], we investigated the isolated stem cells from the adipose tissue niches to identify their changes due to obesity. Indeed, we have previously reported that adipose-derived stem cells (ASC) from obese patients show a differentiation potential and are less proangiogenic than ASC from non-obese individuals [4]. However, how obesity affects ASC and which are the affected genes remain unclear.

Differences in gene expression between subcutaneous and visceral WAT have been reported. As such, genes involved in energy homeostasis and adipogenesis are profoundly altered in obese WAT [5-8]. Additionally, in obese individuals' mature adipocytes, the major WAT-cell types have shown to present an altered inflammation-related gene expression profile [9]. In addition, studies in subcutaneous preadipocytes from type 2 diabetes patients and obese Pima Indian subjects have reported diminished expression of genes involved in differentiation and an upregulation of inflammation-related genes [10,11]. Moreover, obesity has shown to dysregulate the stemness gene network of omental-ASC [12]. However, there are few studies investigating how obesity affects the transcriptome of resident stem cells reservoir.

In this study, we investigated the gene expression profile and the involved biological functions in ASC of

obese patients using a systems biology approach. ASC were isolated from WAT to avoid the contribution of differentiated cells in subcutaneous WAT to the transcriptomic signature. We studied gene expression profile of isolated subcutaneous ASC from patients with obesity and clustering of cardiovascular risk factors and ASC from non-obese healthy individuals. We used a bioinformatic approach with "in silico" analysis to identify biological functions and target genes potentially altered in ASC. Further validation of candidate genes has identified potential targets associated to a reduced regenerative potential.

Results

Patient demographics and ASC phenotypic characterization

ASC were harvested from morbidly obese patients [Body mass index (BMI) = 44.44 ± 1.29 kg/m²], and non-obese individuals (BMI = 22.26 ± 0.88 kg/m²). Although both groups were comparable in age (morbidly obese patients = 41.56 ± 3.07 years; non-obese individuals = 38.28 ± 2.48 years), morbidly obese patients showed significantly ($p < 0.05$) elevated glucose (142.13 ± 11.95 mg/dl vs 61.54 ± 7.35 mg/dl), creatinine levels (0.83 ± 0.07 mg/dl vs 0.55 ± 0.1 mg/dl) and total cholesterol/high density lipoprotein cholesterol (HDL) ratio (5.92 ± 0.48 vs 3.98 ± 0.38), and lower HDL cholesterol levels (33.2 ± 3.05 mg/dl vs 48.32 ± 2.82 mg/dl) as compared to non-obese individuals. No differences were detected in triglyceride, total cholesterol, low density lipoprotein cholesterol (LDL), urea, total proteins and hepatic enzymes levels.

Flow cytometry analysis of isolated ASC from morbidly obese patients (ASC_{mo}) and non-obese individuals (ASC_n) revealed similar ASC phenotype in both groups of cells at passage 3, when the transcriptomic analysis was performed. Both cell types strongly expressed typical ASC surface antigens such as CD90 (Thy-1 cell surface antigen), CD29 (Integrin beta 1), CD44 (Hyaluronic acid receptor), and CD105 (Endoglin) and were negative for CD45, a hematopoietic cell marker, and for CD34, a marker of bone marrow cells, hematopoietic stem cells, endothelial progenitor cells and muscle stem cells (Additional file 1: Table S1). Interestingly the flow cytometry analysis at passage 0 demonstrated that passage 3 cells had similar ASC surface markers levels (CD105, CD29, CD90 and CD44) with respect to passage 0 cells. However, a significant reduction in CD34 and CD45 was found indicating that the passage 3 cells used for transcriptomic analysis were a homogeneous ASC population (Additional file 1: Table S1).

Transcriptomic analysis

In order to compare gene expression patterns between ASC_{mo} and ASC_n, a comprehensive transcriptomic

analysis was performed using Affymetrix whole-transcript expression array. To visualize gene expression data we performed Principal Component Analysis (PCA) that demonstrated the independence of transcriptomic signature in ASCmo and ASCn (Additional file 2: Figure S1). To further explore genes differentially expressed between ASCmo and ASCn, we used modified analysis of variance (ANOVA) analysis. With a p-value < 0.2, a 60% False Discovery Rate (FDR) and a fold change > 1.5, 637 differentially expressed transcripts were detected while with a p-value < 0.1, a 60% FDR and a fold change > 1.5, 457 gene transcripts were detected (Additional file 3: Figure S2). Among the 637 detected genes, 319 exhibited an increased expression in ASCn (fold change range: 1.5 to 7.2) while 318 were overexpressed in ASCmo (fold change range: 1.5 to 18).

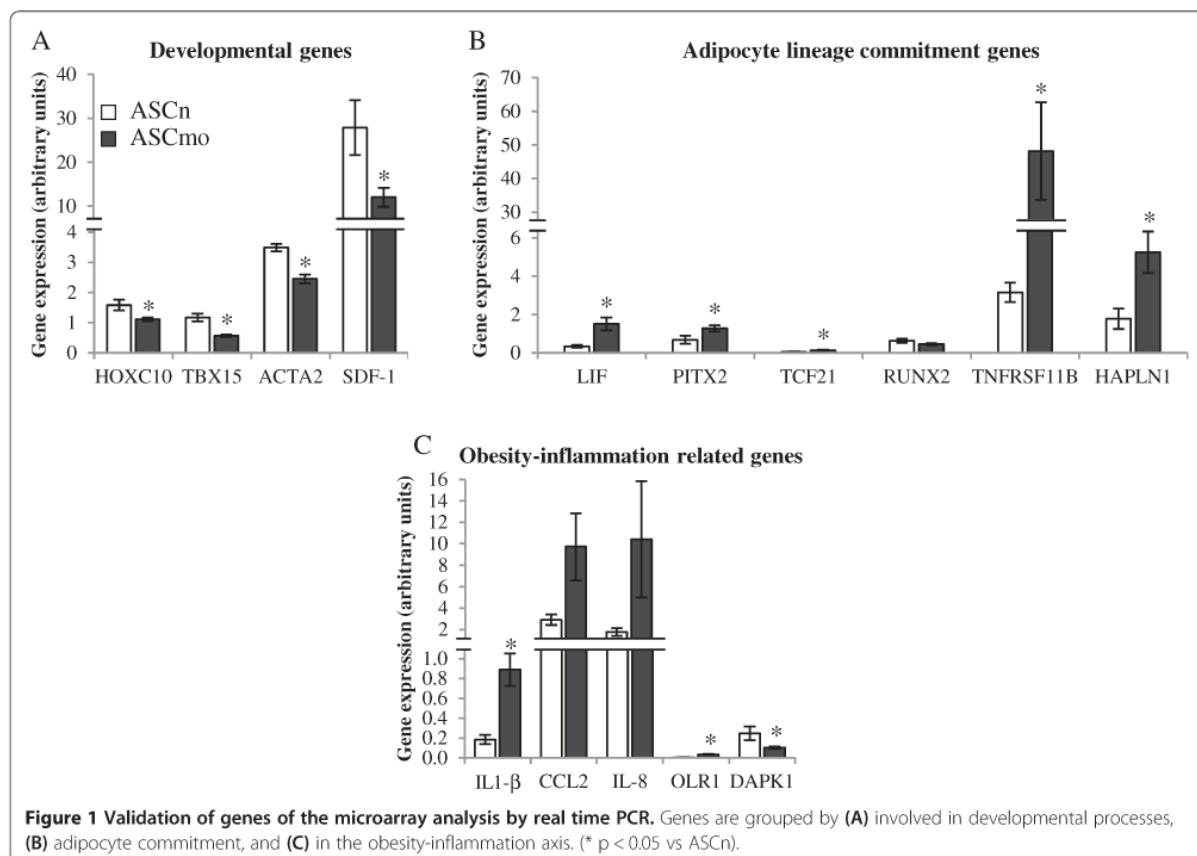
ASCmo and ASCn gene expression patterns

Ingenuity Pathway Analysis (IPA) data identified the most relevant modifications in gene expression in ASCmo. These genes were further validated by real-time PCR (Figure 1). Developmental genes were down-regulated in the ASCmo

compare to ASCn since a significantly reduced expression was observed in HOXC10 (Homeobox C10; -1.42 fold), TBX15 (T-box 15; -2.04 fold), ACTA2 (α -smooth muscle actin; -1.42 fold) and SDF-1 (Stromal cell-derived factor 1/CXCL12; -2.32 fold) (Figure 1A).

Moreover, ASCmo presented a significant up-regulation in genes that induce adipocyte lineage commitment or regulates adipogenesis, such as TCF21 (Transcription factor 21; 2.62 fold), PITX2 (Paired-like homeodomain transcription factor 2; 1.88 fold), LIF (Leukemia inhibitory factor; 4.4 fold), TNFRSF11B (Osteoprotegerin; 15.23 fold) and HAPLN1 (Hyaluronan and proteoglycan link protein 1; 2.94 fold). Contrary RUNX2 (Runt-related transcription factor 2; -1.4 fold), that induces osteoblastogenesis, showed a trend towards a decrease expression in ASCmo compared to ASCn (Figure 1B).

There was an up-regulation in the expression of pro-inflammatory molecules such as IL-1 β (Interleukin-1 β ; 4.81 fold), IL-8 (Interleukin-8; 5.9 fold) and CCL2 (monocyte chemotactic protein-1; 3.35 fold), and OLR1 (oxidized low density lipoprotein receptor 1; 7.62 fold) in ASCmo. The dual pro-apoptotic/pro-survival molecule

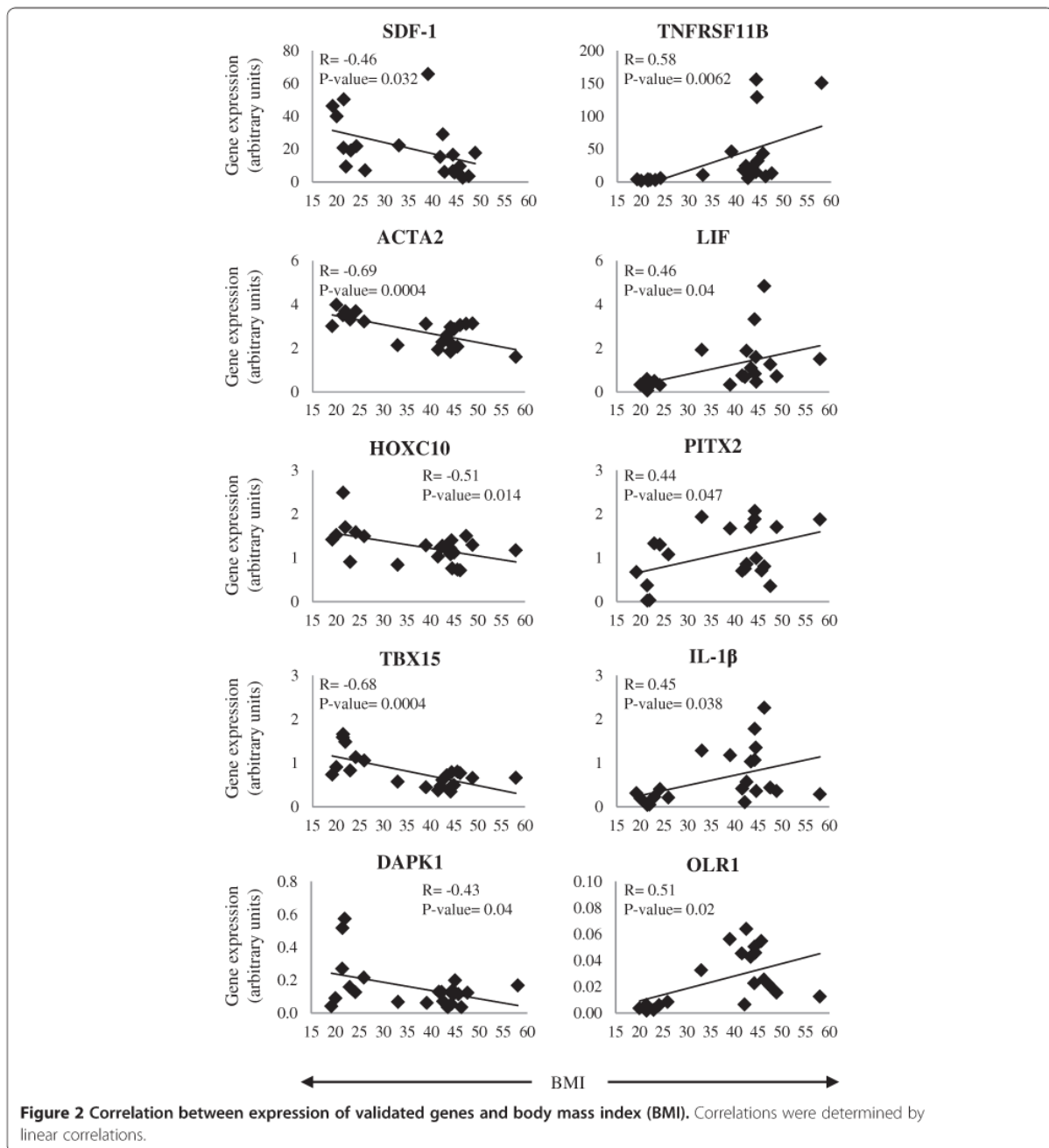


DAPK1 (Death-associated protein kinase 1, -2.40) is down-regulated in ASCmo compared to ASCn (Figure 1C).

Effects of cardiovascular risk factor clustering

Correlation analysis between gene expression and BMI or clustering of cardiovascular risk factors (morbid obesity, high blood pressure, smoking, previous cardiovascular event, dyslipidemia and/or type 2 diabetes) was

performed. Expression levels of ACTA2 (R: -0.69), TBX15 (R: -0.68), SDF-1 (R: -0.46) and DAPK1 (R: -0.43) negatively correlated with BMI increase ($p < 0.05$); whereas LIF (R: 0.46), PITX2 (R: 0.44), TNFRSF11B (R: 0.58), IL-1 β (R: 0.45) and OLR1 (R: 0.51) correlated positively ($p < 0.05$) (Figure 2). Furthermore, ACTA2 (Rho: -5.97), HOXC10 (Rho: -5.29) and TBX15 (Rho: -0.671) negatively correlated with cardiovascular risk factor clustering ($p < 0.05$); while LIF (Rho: 0-477), PITX2 (Rho:



0.459), OLR1 (Rho: 0.485), TNFRSF11B (Rho: 0.805), IL-1 β (Rho: 0.52) and IL-8 (Rho: 0.644) correlated positively ($p < 0.05$) (Figures 3 and 4).

SMAD activation differs between ASCn and ASCmo

Bioinformatic systems biology analysis predicted the SMAD pathway as a potential candidate in the activation/repression of the modified genes in obesity. In order to analyze SMAD pathway activation, we assessed nuclear translocation of phospho-Smad3. We show that ASCmo present a lower activation of SMAD pathway, in fact, phospho-Smad3 nuclear translocation were significantly reduced in the ASCmo (Figure 5).

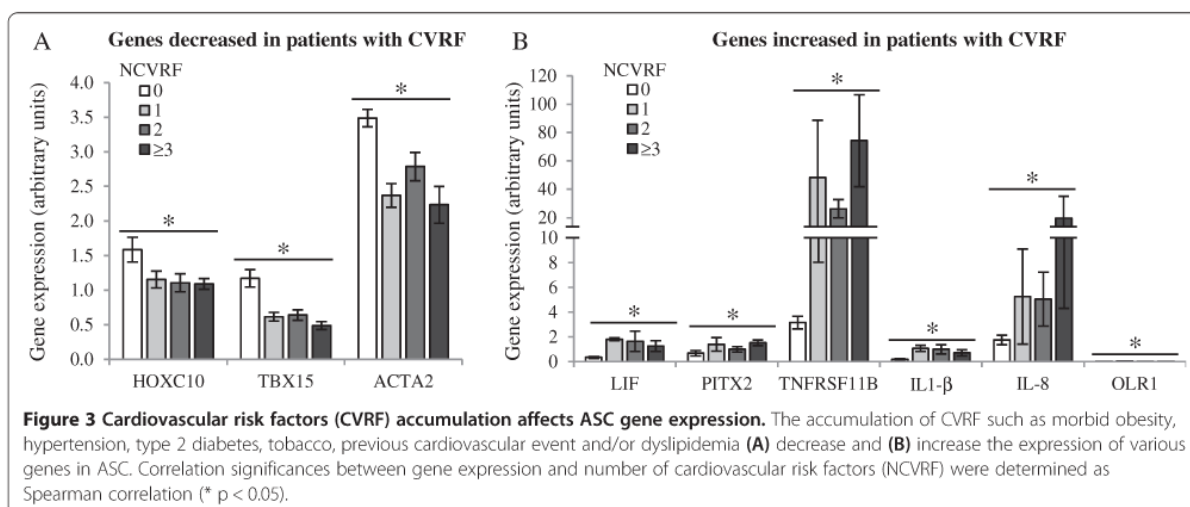
Discussion

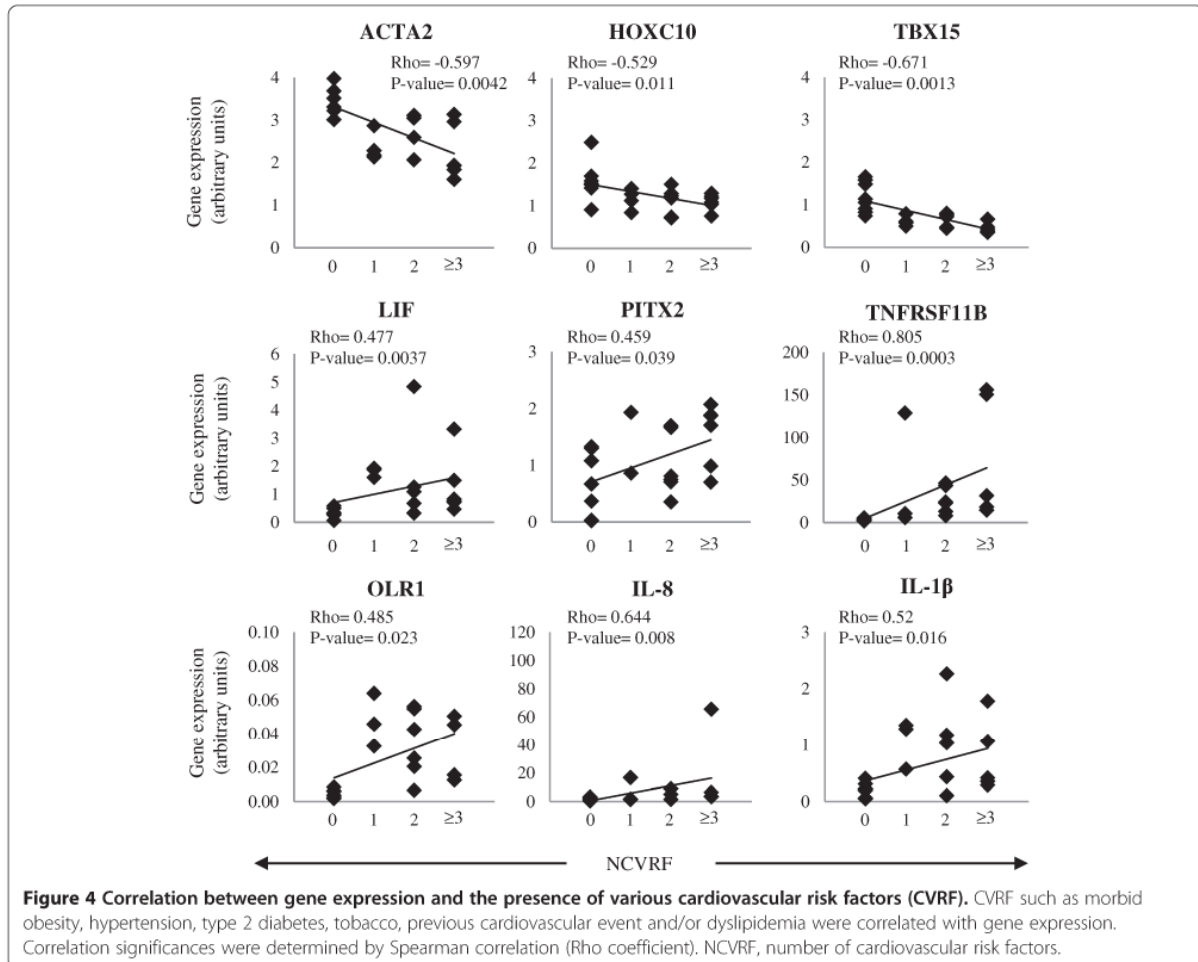
In this study we demonstrate that obesity affects WAT-resident ASC by differentially regulating their gene expression. The transcription of both genes involved in development as well those involved in adipocyte differentiation is significantly modified. Moreover, ASC from obese patients already show upregulation of inflammatory genes. Interestingly, ASC from obese patients with metabolic syndrome (and clustering of cardiovascular risk factors) show further impairment in their transcriptomic profile than ASC from obese metabolically healthy patients.

ASC in morbidly obese patients show similar ASC surface markers (CD44, CD90, CD29 and CD105) to ASC from non-obese individuals. However, we had previously shown that ASCmo have significantly different cell proliferation, differentiation and angiogenic potential [4]. Here we show that ASC from the subcutaneous WAT of morbidly obese patients adopt a significantly modified expression profile with major changes on genes that regulate cell survival, cell differentiation, tissue integrity and metabolic pathways. Interestingly, the ASC

(passage 3; both from non-obese and obese patient abdominal fat) were negative for the surface marker CD34, a marker described for bone marrow cells, hematopoietic stem cells, endothelial progenitor cells and muscle stem cells [13]. In fact, the expression of CD34 by ASC has been a matter of discussion because of contradictory reports and findings [14]. While some authors have described an ASC population that express CD34 [15-17], some others have not been able to detect this marker [1,18,19].

Two highly conserved families of genes involved in embryonic development show down-regulation in ASC from morbidly obese patients: the homeobox (HOXC10) and T-box (TBX15). The HOX code is mainly a “biological fingerprint” of different cell types reflecting a continuation of embryonic patterning [20]. Despite the essential role played by HOX genes in embryonic development, hematopoiesis, cancer, angiogenesis and wound repair, there is limited information on HOX genes in a variety of MSC. Similarly, Tbx15 is one of the fundamental developmental mesodermal transcription factors that is highly expressed in both human and rodent adipose tissue [21]. Here we described for the first time that obesity down-regulates expression of TBX15 and HOXC10 in subcutaneous WAT resident stem cells. The expression of both genes negatively correlates with BMI and cardiovascular risk factor clustering therefore potentially marking a reduced developmental potential of the more differentiated cells of the morbid obesity fat depot. The same result is shown with ACTA2, an ASC gene marker. It has been shown that mice ASC expressing ACTA2 present multilineage differentiation ability compared to ASC that do not express ACTA2 which only display adipogenic commitment [22]. The fact that expression of these three genes are found significantly decreased in ASC from morbidly obese patients

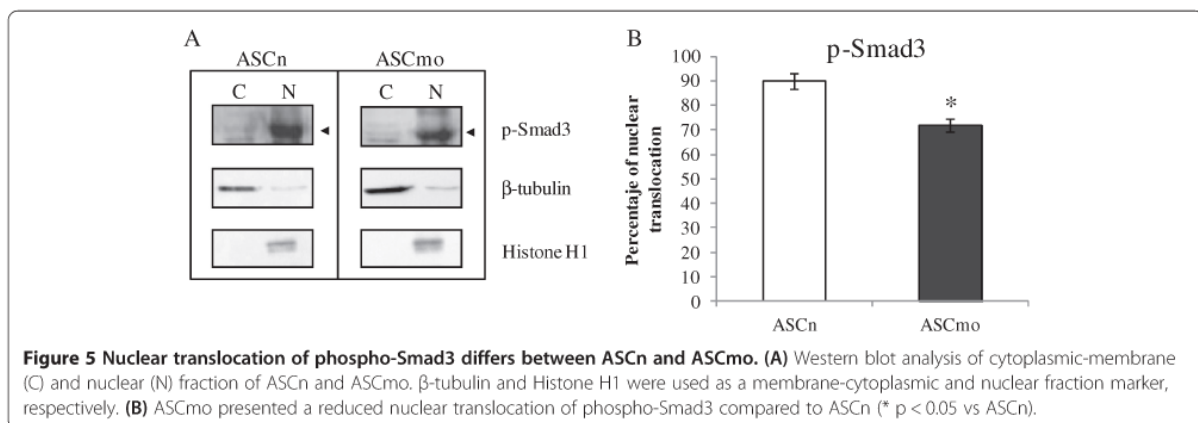




indicates that obesity impairs the multipotency of the stem cells homed into their subcutaneous WAT.

Stem cell migration is a key process for development, spontaneous regeneration and homing. It has been described that the CXCR4-SDF-1 axis regulates cellular

trafficking [23] and that ASC produce and secrete SDF-1 [24]. Circulating SDF-1 levels are decreased in diet-induced obese mice and in adolescents with elevated waist circumference and BMI measures [25]. In this study we show that ASC in morbidly obese patients



show a significant down-regulation in SDF-1 expression, and that the effect is BMI-dependent and correlates with cardiovascular risk factors clustering. These results indicate that obesity seems to impair ASC trafficking and homing.

Given that adipocytes share a common mesenchymal precursor cell with osteoblasts, entrance into the adipocytic or osteoblastic lineage is thought to be mutually exclusive [26]. In fact, our results revealed that the adipogenic lineage is stimulated in ASCmo while osteoblastogenesis is inhibited. We have observed that TCF21 expression, a white WAT-selective marker, is increased in ASCmo. Opposite, RUNX2, an osteoblast marker, presented a non-significant trend to decrease in ASCmo. TCF21 is the first useful positive selection marker for white preadipocytes and plays an important role in adipogenesis. It has been shown that TCF21 suppresses myogenesis [27]. Of interest, PITX2 that is known to upregulate the expression of TCF21 [28], is up-regulated in ASCmo explaining the increase in TCF21 expression.

On the other hand, we detected that ASCmo presented an increased expression in LIF and TNFRSF11B genes. Various studies of LIF in adipose tissue have suggested that adipogenesis could be modulated by this gp130 cytokine at certain stages of development while regulating the expression of genes associated with lipid metabolism [29]. Furthermore, TNFRSF11B (Osteoprotegerin) is a glycoprotein of the tumor necrosis factor (TNF) receptor superfamily that was originally discovered as bone resorption inhibitor [30]. Its expression is high in human WAT, and is increased during 3T3-L1 adipocyte differentiation and under TNF- α and IL-1 β stimulation [31]. In humans, plasma TNFRSF11B levels are elevated in patients with cardiovascular risk factors such as type 2 diabetes and abdominal obesity [32]. We have also detected that both LIF and TNFRSF11B levels positively correlate with BMI and the clustering of cardiovascular risk factors. Moreover, RUNX2 is involved in inhibiting adipocyte differentiation and appears to be down-regulated during 3T3-L1 adipocyte differentiation [33] and obesity reduces bone RUNX2 expression leading to bone marrow adiposity [34]. Interestingly, it has been published that ASC from WAT of obese patients show abnormal upregulation of peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPARG), a gene that reveals a high adipogenic potential [12,35]. All together these observations indicate that morbid obesity not only affects ASC multilineage potential but commit ASC to adipogenic lineage.

Recent studies demonstrate that during adipogenesis and development of obesity, the extracellular matrix (ECM) undergoes structural remodeling affecting adipose tissue expandability and functional integrity [36]. Analysis of the secretome of human ASC identified

various components of the ECM synthesis and remodeling [37]. The glycosaminoglycan hyaluronan is an integral component of ECM with an important role in organizing and maintaining the integrity of the ECM. Although hyaluronan regulates differentiation of mesenchymal lineage cells to chondrocytes and osteoblasts [38], it has been also shown that hyaluronan increases adipogenesis efficiency likely because it provides an appropriate ECM [39]. In fact, it has been demonstrated that hyaluronan synthesis, in 3T3-L1, appears at the stages where early adipocyte markers develop and correlates with triglyceride accumulation [40]. Interestingly we have detected in ASCmo higher levels of HAPLN1, a member of the hyaluronan and proteoglycan binding link protein gene family that stabilizes the interaction between hyaluronan and versican, two ECM components that contribute to the viscoelastic properties observed during 3T3-L1 adipogenic differentiation [40]. More experiments are needed to address how obesity and cardiovascular risk factors modify the adipose tissue ECM and its expandability.

Obesity is associated with a low-grade chronic inflammation [41]. Paracrine and autocrine signaling in WAT-cells may further enhance inflammation, ultimately increasing proinflammatory cytokines production [41]. Yet, it seems that adipocytes and mainly stromal vascular cells appear to be involved in the local production of such cytokines [11,42]. Here we show that obesity induces inflammatory gene up-regulation already in the stem cells. IL-1 β , IL-8 and CCL2 genes are up-regulated in ASCmo. In fact, while we detected that IL-1 β increase is affected by BMI, IL-8 expression is correlated with cardiovascular risk factors clustering. IL-1 β and IL-8 are considered the prototypical proinflammatory cytokines involved in stimulating the synthesis and secretion of a variety of other interleukins, and also participates in a variety of cell functions [42]. Furthermore, high circulating levels of IL-8 and CCL2 have been found in obese subjects increasing the risk of coronary artery disease and type 1 or 2 diabetes [43]. In fact, IL-8 released from subcutaneous WAT and omental-ASC displayed a positive correlation with BMI [12,44], whereas CCL2 expression was higher in subcutaneous adipocytes of obese than non-obese Pima Indians [9].

Furthermore, we report for the first time that ASCmo show increased expression of OLR1 (LOX-1), a lectin-like receptor for oxidized-LDL. OLR1 is expressed in highly vascularized tissues, plays critical roles in the development of atherosclerosis and related disorders, and is upregulated in hypertensive, dyslipidemic, and diabetic animals and humans [45,46]. A recent study reported that oxidized-LDL-OLR1 interaction induces the generation of reactive oxygen species and stimulates pro-inflammatory gene expression [47]. Thus, the effects

of OLR1 in obesity could be related to a complex state of inflammation and adipocyte death. In this study we identified that although OLR1 expression levels in ASC is low, morbid obesity and clustering of cardiovascular risk factors significantly increases ASC OLR1 expression.

Finally, we have observed a significantly reduced expression of DAPK1 in ASCmo. The death-associated protein kinase-1 (DAPK1) is the prototypic member of a family of death-related kinases. However, DAPKs can also act as a survival factors and block apoptosis in response to certain cytokine signals modulating the balance between pro-apoptotic and pro-survival pathways [48].

To address the signaling pathways differentially activated in ASCmo, the validated gene expression data was analyzed in silico with the IPA software to obtain the most probable networks and biological pathways. Candidate proteins identified by IPA were validated by western blot. As such, a lower activation of Smad3 was found in the stem cells of the subcutaneous WAT of obese patients. Interestingly, the transcription factor Smad3 plays a key role in the inhibition of adipocyte differentiation and in the development of insulin resistance [49,50]. This integrated bioinformatic systems biology approach led us to propose a network that regulates the differential gene expression pattern in stem cells found in subcutaneous fat of morbidly obese patients (Figure 6).

Our data does not help to explain the obesity paradox. Indeed, studies of patients with chronic heart disease suggest that overweight and obese patients may paradoxically have better outcomes than lean patients. This

results may associate adiposity with enhanced cardiovascular autoreparative potential [51]. However our previous results [4] and these here reported indicate that obesity renders ASC less multipotent leaving the paradox unsolved. An alternative not yet fully explored possibility is that obesity could promote MSC recruitment in order to perpetuate adipose tissue formation [2], and consequently lead to increase number of circulating MSC which in turn, upon organ damage, could migrate to the site of injury for repair [52].

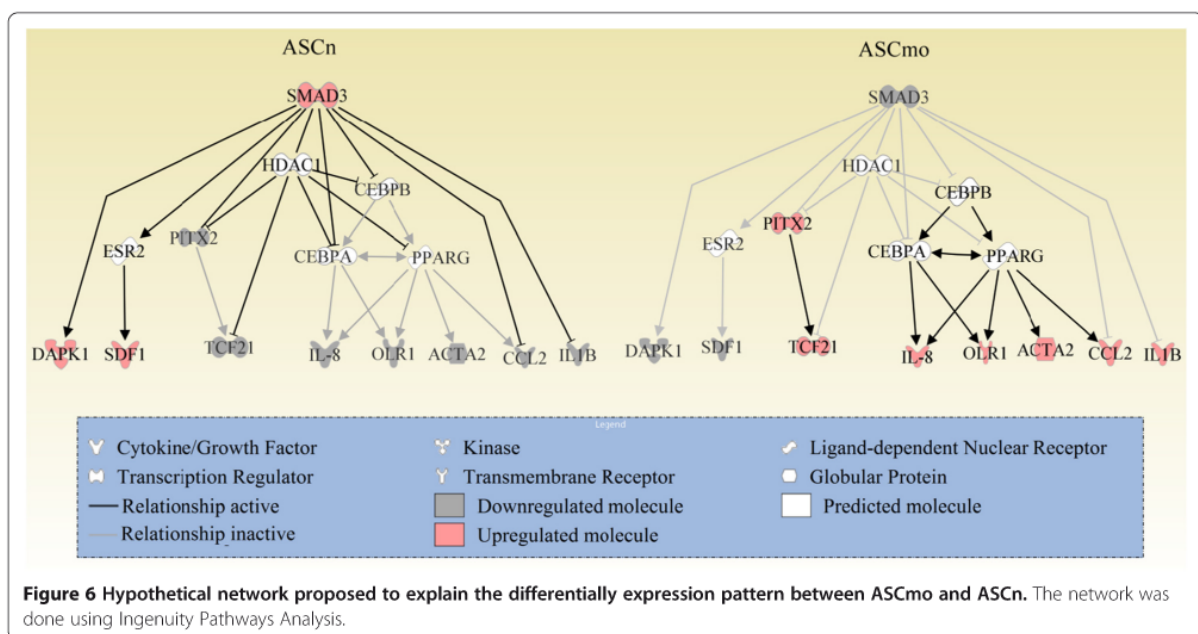
Conclusions

In summary, obesity produces a detrimental effect on its resident stem cells. In fact, the ASC undifferentiated multipotent state is impaired in obese patients with respect to non-obese individuals. This study provides a global systems biology analysis of highly modified genes expressed in ASC from patients with obesity and cardiovascular risk factor clustering that shows how the WAT niche affect resident stem cells. A remaining question that deserves further investigation is whether obesity affects the mesenchymal stem cell transcription potential in the adipose tissue reservoir or stem cells are already conditioned by obesity in the patient's bone marrow.

Methods

Subjects

Subcutaneous abdominal WAT was obtained via surgical resection from morbidly obese patients (BMI > 40 kg/m²; n = 16) that underwent bypass gastric surgery, and from non-obese individuals (BMI < 25 kg/m²; n = 8)



who underwent abdominal lipectomy. Tissues were obtained with informed consent and the study protocol was approved by the Centro Medico Teknon's Ethical Committee consistent with the principles of the Declaration of Helsinki. Blood samples from all subjects were obtained at the time of intervention in order to evaluate the following biochemical parameters: glucose, triglyceride, total cholesterol, HDL, LDL, urea, total proteins, glutamic oxaloacetic transaminase, glutamic pyruvic transaminase, and creatinine levels. Patients used regular medication as recommended in the guidelines if it was necessary. In order to analyze the effect of cardiovascular risk factors (morbid obesity, high blood pressure, smoking, dyslipidemia, type 2 diabetes and/or previous cardiovascular event), individuals were clustered according to the accumulated cardiovascular risk factors: 0) non-obese individuals, 1) morbid obesity, 2) morbid obesity and one additional risk factor (high blood pressure or dyslipidemia), ≥ 3) morbid obesity and two or more risk factors (patients with metabolic syndrome).

ASC isolation and culture

Isolation of ASCmo and ASCn was performed as we have previously described [4]. Briefly, AT was washed, minced and digested with 1 mg/ml Collagenase I-A (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, USA) in Dulbecco's modified Eagle's Medium high glucose (Gibco; Life Technologies, Inc., Grand Island, NY, USA) for 1 h at 37°C with gentle agitation. The digested tissue was sequentially filtered through a 100 μ m mesh and centrifuged for 10 min at 1200 rpm at room temperature. The supernatant, containing mature adipocytes, was aspirated and the pellet was identified as the stromal vascular fraction (SVF). SVF was resuspended in culture medium (Dulbecco's modified Eagle's Medium supplemented with 10% fetal bovine serum, 100 U/ml penicillin and 100 μ g/ml streptomycin; Life Technologies, Paisley, UK) and seeded at 2×10^5 cells/cm². Finally, these cells were incubated overnight at 37°C, 5% CO₂ under hypoxic conditions (1% O₂); 24 h after incubation, the medium was changed to remove non-adherent cells. These primary adherent cells are referred as ASC passage 0 (cultured for 7 days until they reached 75-90% confluence). For further passages cells were detached by trypsin digestion.

Flow cytometry characterization

For further characterization, cell surface antigen phenotype was performed on ASCmo and ASCn at passage 0 and passage 3. The following cell-surface epitopes were marked with anti-human antibodies: CD105-fluorescein isothiocyanate (GeneTex), CD90-fluorescein isothiocyanate (FITC), CD29-phycoerythrin (PE), CD44-FITC, CD34-PE-Cy⁵ and CD45-PE (BD Biosciences; San

Diego, CA, USA). Mouse isotype antibodies served as control (BD Biosciences). Cellular events (30000) were acquired and analyzed by Fluorescence-activated cell sorting using Coulter EPICS XL flow cytometer (Beckman Coulter) running Expo32 software (Beckman Coulter).

Transcriptomic analysis

The whole genome expression was assessed by independently run microarrays in isolated human ASCmo (n = 3) and ASCn (n = 3) cultured under hypoxic conditions (passage 3) using GeneChip Human Gene 1.0 ST arrays (Affymetrix; Santa Clara, CA, USA). Total cell RNA was extracted using silica-membrane columns (RNesasy Mini Kit, Qiagen; Valencia, CA, USA). RNA quantification was determined spectrophotometrically using the Nanodrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA, USA). RNA quality was measured using Agilent 2100 Bioanalyzer technology (Agilent Technologies; Santa Clara, CA, USA) with the Agilent RNA 6000 Nano Kit (Agilent Technologies). Only RNA samples with RIN > 7 (RNA integrity number) values were chosen for microarray experiments. Using the Ambion WT Expression Kit (Ambion, Life Technologies, Paisley, UK) 200 ng of total RNA (mixed with poly-A controls; Affymetrix) were converted to double strand DNA, in two steps, in order to obtain cRNA by an in vitro transcription. Single strand DNA was obtained from 10 μ g of cRNA. Then 5.5 μ g of single strand DNA were fragmented and labelled with biotin using the WT Terminal Labeling Kit (Affymetrix). Hybridization controls from the Hybridization, Wash and Stain Kit (Affymetrix) were added to the sample. Every sample was hybridized to GeneChip Human Gene 1.0 ST array during 16 h at 45°C and 60 rpm, according to manufacturer's instructions. Hybridization, washing, staining and scanning of microarrays were performed according to Affymetrix instructions using the Affymetrix GeneChip 3000 7G System (645 Hybridization Oven, 450 Fluidic Station and GeneChip 3000 7G Scanner).

Raw data were pre-processed with Robust Multiarray Average (RMA) method [53]: background correction, quantile normalization and median polish summarization of the probes. Bioinformatics was used to analyze the extracted log₂ expression data. The raw data from the array experiments has been deposited in NCBI's Gene Expression Omnibus [54] and is accessible through GEO Series accession number (GSE48964; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE48964>).

Microarray quality control and statistical analyses were performed using the Partek Genomics Suite software (Partek Inc., St Louis, Missouri, USA). PCA procedure was used to represent samples variability, which defines a group of Principal Components in order to explain the

variability existing between the samples. ANOVA, modified by Partek Inc, was used for statistical comparisons between groups. Derived p-values were adjusted for multiple testing with the method of Benjamini and Hochberg [55]. Adjusted p-value, FDR <0.6 and fold change $\geq \pm 1.5$ were used to obtain differential expressed genes. Some of the modified genes were validated using real-time PCR in ASC from additional non-obese individuals (n = 8) and morbidly obese patients (n = 16). Differential expressed genes were associated with biological functions and/or diseases based on literature and the Ingenuity Knowledge Base. Differential expressed genes were analyzed through the use of IPA (Ingenuity® Systems, www.ingenuity.com). 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 data set is due to chance alone. The data set from our study was used to construct hypothetical protein interaction based on a regularly updated Ingenuity Pathways Knowledge Base. The networks are displayed graphically as nodes (individual proteins) and edges (the biological relationships between the nodes). The relationships include direct and indirect protein interactions.

Real time PCR validation

In order to validate the generated data, genes of interest that showed a statistically significant difference in expression were validated using custom Taqman Low Density Arrays and real-time PCR assays according to manufacturer's instructions (Applied Biosystems, Life Technologies). Relative gene expression values were calculated by the $\Delta\Delta C_t$ method [56]. The raw gene expression values were normalized according to the expression of TATA-binding protein (TBP) gene.

Western blotting

ASC subcellular fractionation and western blot analysis were performed to analyze proteins levels and nuclear translocation in non-obese individuals (n = 7) and morbidly obese patients (n = 9).

Subcellular fractionation analysis was performed to evaluate phospho-Smad3 nuclear translocation. Nuclear and membrane-cytoplasmic proteins were extracted from ASCn and ASCmo cultured under hypoxic conditions as previously described [57]. The extraction was performed on ice to avoid denaturation of the proteins. Equivalent amounts of proteins were subjected to electrophoresis on 10-12% gels and then transferred to nitrocellulose membrane. After blocking in 5% nonfat milk 1 h at room temperature, blots were incubated with anti-phospho-Smad2/3 goat polyclonal (Santa Cruz Biotechnology; Santa Cruz, CA, USA), anti- β -tubulin rabbit polyclonal (Abcam; Cambridge, UK) and anti-Histone H1 mouse monoclonal (Millipore; Billerica, MA,

USA) at 4°C overnight. Secondary antibodies consisted of horseradish peroxidase-conjugated antibodies (Dako; Barcelona, Spain) and were detected using SuperSignal chemiluminescence system (Pierce; Rockford, IL, USA). β -tubulin and Histone H1 were used as a membrane-cytoplasmic and nuclear fraction marker, respectively. Protein expression was determined using Image Lab™ Software (BIO RAD). Nuclear translocation was calculated as a relation between nuclear protein vs total protein (nuclear + membrane/cytoplasmic protein) quantification.

Additional statistical analyses

Results are expressed as means \pm standard error mean. Statistical Analyses were performed using StatView® software (SAS Institute Inc.). The statistical significance was assessed by unpaired Student's *t*-test. Correlation analyses between gene expression and BMI or number of cardiovascular risk factors were determined by linear regression and Spearman correlation, respectively. P-value < 0.05 was considered statistically significant.

Additional files

Additional file 1: Table S1. Phenotypical characterization of ASC. Flow cytometry analysis of ASCn and ASCmo at passage 0 and 3 were performed in order to characterize ASC populations. Data are presented as means \pm standard error mean.

Additional file 2: Figure S1. Principal component analysis (PCA) of genomic expression data from ASC from different donors.

Additional file 3: Figure S2. Heat map of genes displaying 1.5-fold difference in expression between ASC individuals groups.

Abbreviations

ASC: Adipose-derived stem cells; ASCn: ASC derived from non-obese individuals; ASCmo: ASC derived from morbid obese patients; BMI: Body mass index; CVRF: Cardiovascular risk factors; FDR: False discovery rate; HDL: High density lipoprotein cholesterol; LDL: Low density lipoprotein cholesterol; MSC: Mesenchymal stem cells; PCA: Principal component analysis; PCR: Polymerase chain reaction; SVF: Stromal vascular fraction; WAT: White adipose tissue.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interest.

Authors' contributions

BO performed experiments, interpreted results and wrote the manuscript; GV designed strategy for experimental planning and reviewed the manuscript; SC-L performed experiments and revised the manuscript; JY was in charge of medical patients follow-up; AD-C, CB-L, FM and JH were surgeon in charge of bariatric surgery sample collection; LB planned, evaluated and interpreted experiments and wrote the article. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgments

This work was supported by Grants SAF 2010/16549, Retic-RIC (RD12/0042/0027) and Retic-TERCEL RD/06/0010/0017 from Instituto Salud Carlos III, Madrid, Spain; and Fundación Jesús Serra, Barcelona, Spain. L. B. is the Cardiovascular Research Chair, UAB, Barcelona, Spain. B. O. is the recipient of a Predoctoral Fellowship from Instituto Salud Carlos III, Madrid, Spain. G. V. is a recipient of a contract from the Innovation and Science Spanish Ministry (RyC-2009-5495), MICINN, Spain. The authors thank Marta Sánchez for her technical support.

Author details

¹Cardiovascular Research Center, CSIC-ICCC, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, IIB-Sant Pau, Barcelona, Spain. ²Quirúrgica cirujanos Asociados, Centro Médico Teknon, Barcelona, Spain. ³C.L.B Centro laparoscópico Doctor Ballesta, Barcelona, Spain. ⁴Resistencia a la Insulina SL, Barcelona, Spain. ⁵Department of Plastic Surgery, Centro Médico Teknon, Barcelona, Spain.

Received: 16 April 2013 Accepted: 11 September 2013
 Published: 16 September 2013

References

- Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P, Hedrick MH: **Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells.** *Mol Biol Cell* 2002, **13**:4279–4295.
- Mansilla E, Diaz Aquino V, Zambon D, Marin GH, Martire K, Roque G, Ichim T, Riordan NH, Patel A, Sturla F, et al: **Could metabolic syndrome, lipodystrophy, and aging be mesenchymal stem cell exhaustion syndromes?** *Stem Cells Int* 2011, **2011**:943216.
- Tchkonina T, Giorgadze N, Pirtskhalava T, Thomou T, DePonte M, Koo A, Forse RA, Chinnappan D, Martin-Ruiz C, Von Zglinicki T, Kirkland JL: **Fat depot-specific characteristics are retained in strains derived from single human preadipocytes.** *Diabetes* 2006, **55**:2571–2578.
- Oñate B, Vilahur G, Ferrer-Lorente R, Ybarra J, Diez-Caballero A, Ballesta-Lopez C, Moscatiello F, Herrero J, Badimon L: **The subcutaneous adipose tissue reservoir of functionally active stem cells is reduced in obese patients.** *FASEB J* 2012, **26**:4327–4336.
- Gomez-Ambrosi J, Catalan V, Diez-Caballero A, Martinez-Cruz LA, Gil MJ, Garcia-Foncillas J, Cienfuegos JA, Salvador J, Mato JM, Fruhbeck G: **Gene expression profile of omental adipose tissue in human obesity.** *FASEB J* 2004, **18**:215–217.
- Von Eyben FE, Kroustrup JP, Larsen JF, Celis J: **Comparison of gene expression in intra-abdominal and subcutaneous fat: a study of men with morbid obesity and nonobese men using microarray and proteomics.** *Ann N Y Acad Sci* 2004, **1030**:508–536.
- Baranova A, Collantes R, Gowder SJ, Elariny H, Schlauch K, Younoszai A, King S, Randhawa M, Pusulury S, Alsheddi T, et al: **Obesity-related differential gene expression in the visceral adipose tissue.** *Obes Surg* 2005, **15**:758–765.
- Rodriguez-Acebes S, Palacios N, Botella-Carretero JJ, Olea N, Crespo L, Peromingo R, Gomez-Coronado D, Lasuncion MA, Vazquez C, Martinez-Botas J: **Gene expression profiling of subcutaneous adipose tissue in morbid obesity using a focused microarray: distinct expression of cell-cycle- and differentiation-related genes.** *BMC Med Genomics* 2010, **3**:61.
- Lee YH, Nair S, Rousseau E, Allison DB, Page GP, Tataranni PA, Bogardus C, Permana PA: **Microarray profiling of isolated abdominal subcutaneous adipocytes from obese vs non-obese Pima Indians: increased expression of inflammation-related genes.** *Diabetologia* 2005, **48**:1776–1783.
- Van Tienen FH, Van der Kallen CJ, Lindsey PJ, Wanders RJ, Van Greevenbroek MM, Smeets HJ: **Preadipocytes of type 2 diabetes subjects display an intrinsic gene expression profile of decreased differentiation capacity.** *Int J Obes (Lond)* 2011, **35**:1154–1164.
- Nair S, Lee YH, Rousseau E, Cam M, Tataranni PA, Baier LJ, Bogardus C, Permana PA: **Increased expression of inflammation-related genes in cultured preadipocytes/stromal vascular cells from obese compared with non-obese Pima Indians.** *Diabetologia* 2005, **48**:1784–1788.
- Roldan M, Macias-Gonzalez M, Garcia R, Tinahones FJ, Martin M: **Obesity short-circuits stemness gene network in human adipose multipotent stem cells.** *FASEB J* 2011, **25**:4111–4126.
- Hombach-Klonisch S, Panigrahi S, Rashedi I, Seifert A, Alberti E, Pocar P, Kurpisz M, Schulze-Osthoff K, Mackiewicz A, Los M: **Adult stem cells and their trans-differentiation potential—perspectives and therapeutic applications.** *J Mol Med (Berl)* 2008, **86**:1301–1314.
- Tarnok A, Ulrich H, Bocsi J: **Phenotypes of stem cells from diverse origin.** *Cytometry A* 2010, **77**:6–10.
- Festy F, Hoareau L, Bes-Houtmann S, Pequignot AM, Gonthier MP, Munstun A, Hoarau JJ, Cesari M, Roche R: **Surface protein expression between human adipose tissue-derived stromal cells and mature adipocytes.** *Histochem Cell Biol* 2005, **124**:113–121.
- Gronthos S, Zannettino AC, Hay SJ, Shi S, Graves SE, Kortessidis A, Simmons PJ: **Molecular and cellular characterisation of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow.** *J Cell Sci* 2003, **116**:1827–1835.
- Zimmerlin L, Donnenberg VS, Rubin JP, Donnenberg AD: **Mesenchymal markers on human adipose stem/progenitor cells.** *Cytometry A* 2013, **83**:134–140.
- Musumeci G, Lo Furno D, Loreto C, Giuffrida R, Caggia S, Leonardi R, Cardile V: **Mesenchymal stem cells from adipose tissue which have been differentiated into chondrocytes in three-dimensional culture express lubricin.** *Exp Biol Med (Maywood)* 2011, **236**:1333–1341.
- De Ugarte DA, Morizono K, Elbarbary A, Alfonso Z, Zuk PA, Zhu M, Dragoo JL, Ashjian P, Thomas B, Benhaim P, et al: **Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow.** *Cells Tissues Organs* 2003, **174**:101–109.
- Morgan R: **Hox genes: a continuation of embryonic patterning?** *Trends Genet* 2006, **22**:67–69.
- Gesta S, Bluher M, Yamamoto Y, Norris AW, Berndt J, Kralisch S, Boucher J, Lewis C, Kahn CR: **Evidence for a role of developmental genes in the origin of obesity and body fat distribution.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2006, **103**:6676–6681.
- Cai X, Lin Y, Hauschka PV, Grottkau BE: **Adipose stem cells originate from perivascular cells.** *Biol Cell* 2011, **103**:435–447.
- Nervi B, Link DC, DiPersio JF: **Cytokines and hematopoietic stem cell mobilization.** *J Cell Biochem* 2006, **99**:690–705.
- Kondo K, Shintani S, Shibata R, Murakami H, Imaizumi M, Kitagawa Y, Murohara T: **Implantation of adipose-derived regenerative cells enhances ischemia-induced angiogenesis.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009, **29**:61–66.
- Jung C, Fischer N, Fritzenwanger M, Pernow J, Brehm BR, Figulla HR: **Association of waist circumference, traditional cardiovascular risk factors, and stromal-derived factor-1 in adolescents.** *Pediatr Diabetes* 2009, **10**:329–335.
- Sordella R, Jiang W, Chen GC, Curto M, Settleman J: **Modulation of Rho GTPase signaling regulates a switch between adipogenesis and myogenesis.** *Cell* 2003, **113**:147–158.
- Funato N, Ohyama K, Kuroda T, Nakamura M: **Basic helix-loop-helix transcription factor epicardin/capsulin/Pod-1 suppresses differentiation by negative regulation of transcription.** *J Biol Chem* 2003, **278**:7486–7493.
- Shih HP, Gross MK, Kioussi C: **Cranial muscle defects of Pitx2 mutants result from specification defects in the first branchial arch.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2007, **104**:5907–5912.
- White UA, Stephens JM: **The gp130 receptor cytokine family: regulators of adipocyte development and function.** *Curr Pharm Des* 2011, **17**:340–346.
- Kwon BS, Wang S, Udagawa N, Haridas V, Lee ZH, Kim KK, Oh KO, Greene J, Li Y, Su J, et al: **TR1, a new member of the tumor necrosis factor receptor superfamily, induces fibroblast proliferation and inhibits osteoclastogenesis and bone resorption.** *FASEB J* 1998, **12**:845–854.
- An JJ, Han DH, Kim DM, Kim SH, Rhee Y, Lee EJ, Lim SK: **Expression and regulation of osteoprotegerin in adipose tissue.** *Yonsei Med J* 2007, **48**:765–772.
- Browner WS, Lui LY, Cummings SR: **Associations of serum osteoprotegerin levels with diabetes, stroke, bone density, fractures, and mortality in elderly women.** *J Clin Endocrinol Metab* 2001, **86**:631–637.
- Zhang YY, Li X, Qian SW, Guo L, Huang HY, He Q, Liu Y, Ma CG, Tang QQ: **Down-regulation of type I Runx2 mediated by dexamethasone is required for 3T3-L1 adipogenesis.** *Mol Endocrinol* 2012, **26**:798–808.
- Halade GV, El Jamali A, Williams PJ, Fajardo RJ, Fernandes G: **Obesity-mediated inflammatory microenvironment stimulates osteoclastogenesis and bone loss in mice.** *Exp Gerontol* 2011, **46**:43–52.
- Baptista LS, Da Silva KR, Da Pedrosa CS, Claudio-da-Silva C, Carneiro JR, Aniceto M, De Mello-Coelho V, Takiya CM, Rossi MI, Borojevic R: **Adipose tissue of control and ex-obese patients exhibit differences in blood vessel content and resident mesenchymal stem cell population.** *Obes Surg* 2009, **19**:1304–1312.
- Lee MJ, Wu Y, Fried SK: **Adipose tissue remodeling in pathophysiology of obesity.** *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2010, **13**:371–376.
- Chiellini C, Cochet O, Negroni L, Samson M, Poggi M, Ailhaud G, Alessi MC, Dani C, Amri EZ: **Characterization of human mesenchymal stem cell secretome at early steps of adipocyte and osteoblast differentiation.** *BMC Mol Biol* 2008, **9**:26.
- Huang L, Cheng YY, Koo PL, Lee KM, Qin L, Cheng JC, Kumta SM: **The effect of hyaluronan on osteoblast proliferation and differentiation in rat calvarial-derived cell cultures.** *J Biomed Mater Res A* 2003, **66**:880–884.
- Allingham PG, Brownlee GR, Harper GS, Pho M, Nilsson SK, Brown TJ: **Gene expression, synthesis and degradation of hyaluronan during differentiation of 3T3-L1 adipocytes.** *Arch Biochem Biophys* 2006, **452**:83–91.

40. Zizola CF, Julianelli V, Bertolesi G, Yanagishita M, Calvo JC: **Role of versican and hyaluronan in the differentiation of 3T3-L1 cells into preadipocytes and mature adipocytes.** *Matrix Biol* 2007, **26**:419–430.
41. Wellen KE, Hotamisligil GS: **Obesity-induced inflammatory changes in adipose tissue.** *J Clin Invest* 2003, **112**:1785–1788.
42. Fain JN: **Release of interleukins and other inflammatory cytokines by human adipose tissue is enhanced in obesity and primarily due to the nonfat cells.** *Vitam Horm* 2006, **74**:443–477.
43. Kim CS, Park HS, Kawada T, Kim JH, Lim D, Hubbard NE, Kwon BS, Erickson KL, Yu R: **Circulating levels of MCP-1 and IL-8 are elevated in human obese subjects and associated with obesity-related parameters.** *Int J Obes (Lond)* 2006, **30**:1347–1355.
44. Bruun JM, Lihn AS, Madan AK, Pedersen SB, Schiott KM, Fain JN, Richelsen B: **Higher production of IL-8 in visceral vs. subcutaneous adipose tissue. implication of nonadipose cells in adipose tissue.** *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2004, **286**:E8–E13.
45. Yan M, Mehta JL, Hu C: **LOX-1 and obesity.** *Cardiovasc Drugs Ther* 2011, **25**:469–476.
46. Chui PC, Guan HP, Lehrke M, Lazar MA: **PPARgamma regulates adipocyte cholesterol metabolism via oxidized LDL receptor 1.** *J Clin Invest* 2005, **115**:2244–2256.
47. Dunn S, Vohra RS, Murphy JE, Homer-Vanniasinkam S, Walker JH, Ponnambalam S: **The lectin-like oxidized low-density-lipoprotein receptor: a pro-inflammatory factor in vascular disease.** *Biochem J* 2008, **409**:349–355.
48. Lin Y, Hupp TR, Stevens C: **Death-associated protein kinase (DAPK) and signal transduction: additional roles beyond cell death.** *FEBS J* 2010, **277**:48–57.
49. Tsurutani Y, Fujimoto M, Takemoto M, Irisuna H, Koshizaka M, Onishi S, Ishikawa T, Mezawa M, He P, Honjo S, *et al*: **The roles of transforming growth factor-beta and Smad3 signaling in adipocyte differentiation and obesity.** *Biochem Biophys Res Commun* 2011, **407**:68–73.
50. Choy L, Derynck R: **Transforming growth factor-beta inhibits adipocyte differentiation by Smad3 interacting with CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) and repressing C/EBP transactivation function.** *J Biol Chem* 2003, **278**:9609–9619.
51. Lavie CJ, Milani RV, Ventura HO: **Obesity and cardiovascular disease: risk factor, paradox, and impact of weight loss.** *J Am Coll Cardiol* 2009, **53**:1925–1932.
52. Bays HE: **Adiposopathy is “sick fat” a cardiovascular disease?** *J Am Coll Cardiol* 2011, **57**:2461–2473.
53. Irizarry RA, Bolstad BM, Collin F, Cope LM, Hobbs B, Speed TP: **Summaries of affymetrix GeneChip probe level data.** *Nucleic Acids Res* 2003, **31**:e15.
54. Edgar R, Domrachev M, Lash AE: **Gene expression omnibus: NCBI gene expression and hybridization array data repository.** *Nucleic Acids Res* 2002, **30**:207–210.
55. Benjamini Y, Hochberg Y: **Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing.** *J R Stat Soc Ser B Methodol* 1995, **57**:289–300.
56. Livak KJ, Schmittgen TD: **Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-delta delta C(T)} method.** *Methods* 2001, **25**:402–408.
57. Arderiu G, Pena 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**:2607–2615.

doi:10.1186/1471-2164-14-625

Cite this article as: Oñate *et al.*: Stem cells isolated from adipose tissue of obese patients show changes in their transcriptomic profile that indicate loss in stemcellness and increased commitment to an adipocyte-like phenotype. *BMC Genomics* 2013 **14**:625.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



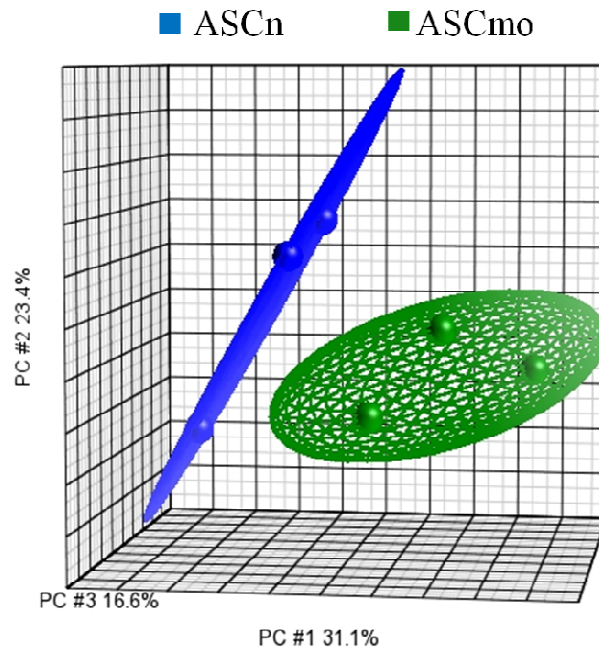
Phenotypical characterization of ASC.

Antigen (%)	Passage 0		Passage 3		P-value P0 vs P3	
	ASCn	ASCmo	ASCn	ASCmo	ASCn	ASCmo
CD105 ⁺	91.2 ± 2.7	83.8 ± 4.2	92.5 ± 1.7	94.5 ± 0.9	<0.05	<0.05
CD29 ⁺	86.0 ± 6.7	86.4 ± 2.6	96.8 ± 1.9	93.1 ± 5.4	Ns	Ns
CD44 ⁺	94.0 ± 2.6	74.1 ± 8.5	90.6 ± 7.5	91.1 ± 7.1	Ns	Ns
CD90 ⁺	91.4 ± 2.2	86.0 ± 3.5	98.3 ± 1.5	99.9 ± 0.1	<0.05	<0.05
CD34 ⁺	8.2 ± 3.9	3.9 ± 1.6	1.1 ± 0.2	0.3 ± 0.1	<0.05	<0.05
CD45 ⁺	4.5 ± 2.2	5.6 ± 2.5	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	<0.05	<0.05

Ns, not significant; P0, passage 0; P3, passage 3.

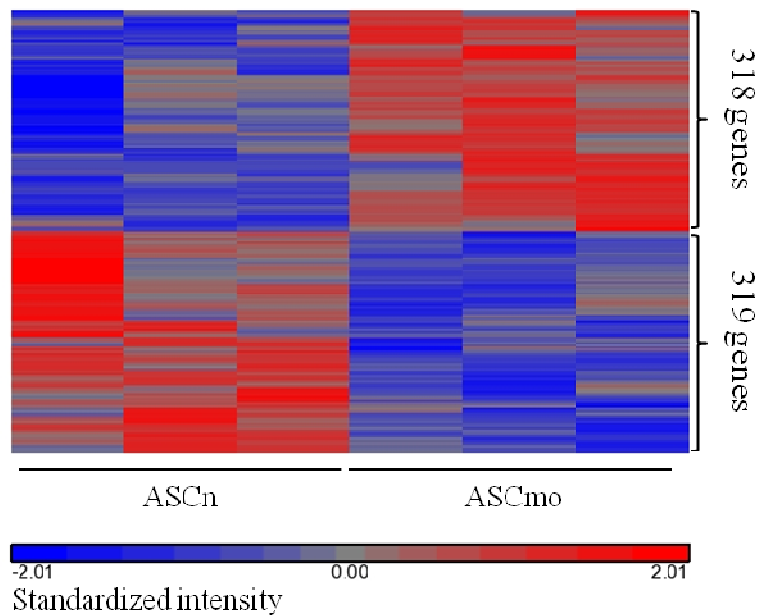
Additional file 1: Table S1. Phenotypical characterization of ASC. Flow cytometry analysis of ASCn and ASCmo at passage 0 and 3 were performed in order to characterize ASC populations. Data are presented as means ± standard error mean.

PCA MAPPING (71.2%)



Additional file 2: Figure S1. Principal component analysis (PCA) of genomic expression data from ASC from different donors.

HEAT MAP (FDR<0.6)



Additional file 3: Figure S2. Heat map of genes displaying 1.5-fold difference in expression between ASC individuals groups.

V. DISCUSIÓN GENERAL

La percepción que tanto la comunidad científica como la población en general tienen del tejido adiposo ha cambiado drásticamente en las últimas décadas. Durante este tiempo, la incidencia de la obesidad ha aumentado alcanzando niveles del 30% en la población adulta estadounidense, y entre el 15 y el 25% en la población europea (Flegal *et al.*, 2010; James, 2010). Este aumento no solo ha provocado cambios sociales sino también cambios en las prácticas clínicas, como un aumento de las cirugías plásticas como la abdominoplastia o los lipoaspirados, poniendo de manifiesto lo fácil que es la obtención abundante de tejido adiposo.

Posiblemente, las células mesenquimales son las células reparadoras más importantes a día de hoy. Desde que se describió que el tejido adiposo contenía una población abundante y accesible de células mesenquimales (Zuk *et al.*, 2001), las ASC, junto con el hecho de que es un tejido muy fácil de obtener, el tejido adiposo se ha convertido en una fuente altamente atractiva de células madre para su uso en terapia celular (Gimble *et al.*, 2007). Ciertamente, las ASC ya se han empezado a usar en varios modelos preclínicos, así como en algunos ensayos clínicos, como fuente de células exógenas para la terapia celular (Gimble *et al.*, 2012). Igualmente, se cree que muchos de los procesos de autoreparación que se llevan a cabo en el organismo de forma natural se producen gracias a la movilización de las diferentes poblaciones de células mesenquimales endógenas. Se ha demostrado que los tejidos dañados del organismo provocan la movilización de estas células mesenquimales, residentes en los tejidos circundantes o que se encuentran en circulación, hasta el lugar de la lesión para ayudar a la reparación tisular (Ito, 2011). No obstante, aún no se conocen completamente los mecanismos por los cuales estas células llevarían a cabo su función reparadora.

Una de las características necesarias que han de tener las células par usarlas en terapia celular es que puedan ser obtenidas en gran cantidad y en el menor tiempo posible. La hipoxia ha sido considerada un importante factor microambiental en varios aspectos de la biología de las células madre ya que aumenta la viabilidad, la supervivencia y la proliferación celular. Del mismo modo se ha descrito que mantiene la capacidad pluripotencial, de diferenciación y migración celular (Ezashi *et al.*, 2005; Grayson *et al.*, 2007; Grayson *et al.*, 2006; Potier *et al.*, 2007a; Rosova *et al.*, 2008), funciones esenciales para la regeneración tisular. Sin embargo, a pesar de que las regiones anatómicas en las que se localizan las células mesenquimales suelen presentar una baja concentración de oxígeno (Carreau *et al.*, 2011), *in vitro* el cultivo de estas células se suele realizar en condiciones de "normoxia" (21% O₂), aunque eso signifique que las células estén creciendo en condiciones de hiperoxia. A pesar de que se ha demostrado que el cultivo en hipoxia, junto con la falta de suero, induce la apoptosis en algunas células mesenquimales (Zhu *et al.*, 2006; Potier *et al.*, 2007b), otros estudios han observado que cultivar ASC o BM-MSC en condiciones bajas de oxígeno fisiológicamente relevantes beneficia la proliferación y la diferenciación celular, favorece la secreción

de factores paracrinos y mejora el potencial de migración, anidamiento (*homing*) y angiogénico de las células transplantadas (Grayson *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2009; Hu *et al.*, 2008; Rasmussen *et al.*, 2010; Thangarajah *et al.*, 2009). De hecho, el potencial de regeneración tisular de las ASC en la reparación del infarto de miocardio o la isquemia periférica (Badimon *et al.*, 2013; Mazo *et al.*, 2011), así como en la cicatrización de heridas (Lee *et al.*, 2009), se ven mejorados cuando las células han sido precondicionadas con la hipoxia. Es por ello que en este trabajo se ha querido analizar el efecto que tendría cultivar las ASC en condiciones de hipoxia.

Los resultados muestran que el cultivo de las ASC en condiciones de hipoxia incrementa su capacidad de proliferación aumentando su cinética de crecimiento celular, y que este efecto es independiente del individuo donante de las ASC (artículo 1). Además, como se comprobó que el perfil de marcadores de superficie de las ASC no se veía afectado por las condiciones de cultivo (artículo 1), se decidió realizar todos los análisis posteriores con ASC cultivadas en condiciones de hipoxia.

Se ha descrito que el hecho de presentar algún factor de riesgo tiene efectos negativos en las células reparadoras endógenas. De hecho, pacientes con hipercolesterolemia, hipertensión o enfermedad coronaria presentan una disminución en la capacidad de proliferación, migración y adhesión de las células progenitoras endoteliales, así como en su capacidad vasculogénica (Vasa *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2004; Ramunni *et al.*, 2010; Tamarat *et al.*, 2004; Heida *et al.*, 2010; Yue *et al.*, 2010). Del mismo modo, se ha descrito que presentar diabetes disminuye la proliferación, la capacidad de adhesión y de incorporarse a estructuras vasculares de las BM-MSc endógenas (Tepper *et al.*, 2002). Referente a las ASC, se ha observado que su funcionalidad y calidad se ven afectadas negativamente por la edad, el género y el tipo de tejido adiposo del que provienen (Madonna *et al.*, 2011; Zhu *et al.*, 2009; Efimenko *et al.*, 2011; Schipper *et al.*, 2008; Kirkland *et al.*, 2002). Sin embargo, existen pocos estudios que analicen el efecto que tiene la obesidad o la presencia de factores de riesgo sobre estas células.

Los estudios realizados en esta tesis han revelado que la obesidad tiene un efecto negativo en las ASC. Inicialmente se observó que el tejido adiposo de pacientes obesos mórbidos presentaba un menor porcentaje de células positivas para el marcador CD90 (artículo 1), proteína que pertenece a la familia de las inmunoglobulinas y que también es conocida como el antígeno de diferenciación de los timocitos-1 (Thy-1), y que es uno de los marcadores característicos de las ASC y del resto de MSC (Kern *et al.*, 2006). Este resultado está relacionado con el estudio de Tchoukalova y col. en el que se describe que los pacientes obesos presentan una reducción del número de preadipocitos (Tchoukalova *et al.*, 2007). Sin embargo, al aislar y cultivar las ASC de ambos grupos de individuos se observó que ambas poblaciones celulares presentaban un fenotipo similar entre sí y con los

marcadores característicos de las ASC (artículo 1): expresión de los marcadores CD90, CD44 (receptor ácido hialurónico), CD29 (integrina beta 1), y CD105 (endoglina), y ausencia de los marcadores CD45 (antígeno leucocitario común) y CD34 (sialomucina). Sin embargo, la expresión de CD34 en las ASC, un marcador característico de las células de la médula ósea, de las células progenitoras endoteliales, y de las células madre hematopoyéticas y musculares (Hombach-Klonisch *et al.*, 2008), presenta contradicciones según el estudio o el grupo de investigación (Tarnok *et al.*, 2010). Algunos autores describen que las ASC expresan CD34 (Festy *et al.*, 2005; Gronthos *et al.*, 2003; Zimmerlin *et al.*, 2013), mientras que otros no (Musumeci *et al.*, 2011; De Ugarte *et al.*, 2003; Zuk *et al.*, 2002). Parece ser que cuando las ASC se encuentran en el tejido adiposo expresan CD34, y que esta expresión va disminuyendo una vez que se expanden *in vitro* (Mitchell *et al.*, 2006; Scherberich *et al.*, 2013), aunque la velocidad en la que ocurre esta pérdida de expresión depende de las condiciones del cultivo. Los resultados de esta trabajo muestran que incluso a pasaje 0, las ASC aisladas presentan una muy baja expresión de CD34, y que ésta se pierde rápidamente una vez que las células se expanden *in vitro*. Estos resultados se observan independientemente del tipo de individuo del que se aíslan las células (artículo 2).

Para evaluar el efecto que tiene la obesidad en las ASC, se compararon algunas de las funciones más características de esta población celular entre las células derivadas de pacientes obesos y de individuos no-obesos. Se observó que la capacidad proliferativa, de diferenciación y el potencial angiogénico se encontraban afectados negativamente por la obesidad. Los resultados de esta tesis muestran que las ASC de pacientes obesos crecen más lento que las provenientes de individuos no-obesos, independientemente de que se cultiven en condiciones de hipoxia (artículo 1). Además, tanto la capacidad de diferenciación adipogénica como a célula endotelial se ven disminuidas en las células aisladas de pacientes obesos (artículo 1). Varios estudios han observado una correlación inversa entre el BMI y la capacidad de diferenciación de los preadipocitos (Isakson *et al.*, 2009). De hecho se ha descrito que en las mujeres la obesidad disminuye la capacidad de diferenciación de las células del estroma vascular del tejido adiposo (Tchoukalova *et al.*, 2007; van Harmelen *et al.*, 2003), y que en los Indios Pima la diferenciación de los preadipocitos correlaciona negativamente con el grado de obesidad central (Permana *et al.*, 2004). En este estudio se ha observado que las ASC derivadas de pacientes obesos presentan una menor capacidad de diferenciación adipogénica ya que, tras la diferenciación, éstas presentan unos niveles de expresión de los genes característicos adipocíticos (LPL y FABP4) menores en comparación con las ASC de individuos no-obesos (artículo 1). Del mismo modo, también se observó diferencias en la capacidad de diferenciación de las ASC a célula endotelial. Aunque ambos grupos celulares fueron capaces de formar estructuras tubulares similares una vez concluido el proceso de diferenciación, la expresión génica de los marcadores

endoteliales fue diferente entre los dos grupos de ASC. Las ASC de pacientes obesos expresaban niveles más altos de VEGFR1 que las de individuos no-obesos, tanto antes como después del proceso de diferenciación. Sin embargo, aunque la expresión de PECAM-1 se vio incrementada tras la diferenciación, no se observaron diferencias entre los dos grupos de ASC. Contrariamente, ninguno de los dos grupos de ASC expresaron VEGFR2, CD34 ni vWF antes ni después de la diferenciación (artículo 1).

Estudios previos en animales demostraron que las ASC presentaban un potencial angiogénico debido a la secreción de diversos factores paracrinos (Sheng *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2011a). De hecho se sabe que las ASC secretan un gran número de factores proangiogénicos, como el VEGF, HGF, IGF-1, TGF β y MCP-1 entre otros, sugiriendo que las ASC presentan un papel muy activo en la revascularización de los tejidos isquémicos (Gnecchi *et al.*, 2005; Rehman *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2006; Nakagami *et al.*, 2005). Por ello, se quiso estudiar si las ASC de pacientes obesos presentaban alguna diferencia en este potencial. Se conoce que la trombospondina-1, una adipoquina con funciones antiangiogénicas, presenta una expresión y una secreción altamente regulada por los niveles de insulina y glucosa en los adipocitos de ratas con obesidad inducida por dieta (García-Díaz *et al.*, 2011), y está altamente expresada en individuos obesos y con resistencia a la insulina (Ramis *et al.*, 2002; Varma *et al.*, 2008). Los resultados de esta tesis muestran que los niveles de expresión de trombospondina-1 son superiores (artículo 1) en las ASC de pacientes obesos. Por ello, se quiso analizar el efecto que tenía el sobrenadante de estas células en la capacidad angiogénica de las HUVEC, observándose que el medio proveniente de las ASC de pacientes obesos disminuye la capacidad de formación de redes tubulares por parte de las HUVEC en comparación con las células de individuos no-obesos (artículo 1), demostrando que la obesidad tiene un efecto negativo en la capacidad angiogénica de las ASC.

Al observar que la obesidad afecta varias de las funciones principales de las ASC, se quiso analizar de qué manera la obesidad modifica el transcriptoma de estas células, y si la acumulación de diversos factores de riesgo también produce un efecto en ellas. Al comparar la expresión génica entre las dos poblaciones de ASC, se observó que ambas poblaciones celulares presentan un perfil transcriptómico claramente diferenciado (artículo 2). Las ASC de pacientes obesos presentan una disminución en la expresión de genes implicados en procesos del desarrollo, mientras que los genes implicados en la determinación de la diferenciación adipogénica y en procesos proinflamatorios se encuentran sobrepresados.

Recientemente se ha observado que el patrón de expresión embrionario se mantiene en los tejidos adultos, especialmente en tejidos con una alta tasa de renovación (Morgan, 2006). Los resultados de esta tesis muestran, por primera vez, que la obesidad disminuye la expresión de dos de

las familias de genes más conservadas e implicadas en el desarrollo (*Homeobox –HOXC10–*, y *T-box –TBX15–*), y del gen característico de las ASC ACTA2 (*Actin, Alpha 2, Smooth Muscle, Aorta*). Se conoce que los genes Hox participan en procesos de hematopoyesis, angiogénesis y cicatrización de heridas (Morgan, 2006). Sin embargo, se tiene muy poca información sobre la función que tienen en las ASC. Se ha descrito que los genes Hox determinan la identidad y el origen del tipo de célula mesenquimal (Ackema and Charite, 2008; Hwang *et al.*, 2009). Del mismo modo, el gen TBX15 es uno de los principales factores de transcripción implicados en el desarrollo del mesodermo (Gesta *et al.*, 2006). Se ha descrito que la expresión de TBX15 en el tejido adiposo está relacionada con los niveles de obesidad así como con el patrón de distribución del tejido adiposo (Gesta *et al.*, 2006). Además, Gesta y col. han demostrado que TBX15 tiene un papel importante en la regulación del desarrollo de los adipocitos (Gesta *et al.*, 2011). Del mismo modo, se ha descrito que la disminución de la expresión de ACTA2 en las ASC está asociada con una pérdida de multipotencialidad (Cai *et al.*, 2011). Los resultados de esta tesis revelan que la obesidad produce una disminución en la expresión de HOXC10, TBX15 y ACTA2 (artículo 2). Además, se observa que estos cambios de expresión están relacionados con los niveles de BMI y la acumulación de diversos factores de riesgo cardiovascular. El hecho de que la expresión de estos tres genes se encuentre significativamente disminuida en las ASC de pacientes obesos mórbidos nos indica que la obesidad afecta y disminuye la capacidad multipotencial de las células madre residentes del tejido adiposo subcutáneo. Estos resultados concuerdan con los descritos anteriormente del artículo 1 en el que se observaba una baja capacidad de diferenciación por parte de las ASC de pacientes obesos.

Los adipocitos y los osteoblastos comparten el mismo tipo de precursor mesenquimal, por lo que la diferenciación a los linajes adipocítico y osteocítico son mutuamente excluyentes (Sordella *et al.*, 2003). Siguiendo con esta idea, los resultados de esta tesis revelan que el linaje adipocítico está inducido en las ASC de pacientes con obesidad mórbida, mientras que la osteoblastogénesis se encuentra inhibida. En los resultados obtenidos en el artículo 2 se observa que el factor de expresión TCF21 (*Transcription factor 21*), un marcador selectivo del tejido adiposo blanco (Funato *et al.*, 2003), y PITX2 (*Paired-like homeodomain 2*), el cual se sabe que promueve la expresión de TCF21 (Shih *et al.*, 2007), se encuentran sobrepresados en las ASC de pacientes obesos mórbidos. TCF21 es el primer marcador de selección positiva para los preadipocitos blancos y juega un papel muy importante en la inducción de la adipogénesis y en la inhibición de la miogénesis (Shih *et al.*, 2007). Del mismo modo, también se observa que los niveles de BMI así como la acumulación de factores de riesgo cardiovascular inducen la sobrepresión de los genes LIF (*Leukemia inhibitory factor*) y TNFRSF11B (*Tumor necrosis factor receptor superfamily member 11b o Osteoprotegerin*), genes implicados en la regulación de la adipogénesis (White and Stephens, 2011; An *et al.*, 2007) (artículo

2). No obstante, la expresión del marcador de osteoblastos RUNX2 (*Runt-related transcription factor 2*), el cual está implicado en la inhibición de la adipogénesis (Zhang *et al.*, 2012), se encuentra disminuido en las ASC de pacientes obesos en comparación con las de no-obesos (artículo 2). Curiosamente, Roldan y col. han descrito, en línea con los resultados de esta tesis, que las ASC del tejido adiposo omental derivadas de pacientes obesos presentan una sobreexpresión de PPAR γ (*Peroxisome proliferator-activated receptor γ*), un gen clave en la adipogénesis (Roldan *et al.*, 2011).

Igualmente, durante la adipogénesis y el desarrollo de la obesidad no sólo se modifican los genes implicados en la vía de diferenciación adipocítica, sino que también se observa una importante remodelación de la matriz extracelular que afecta a la integridad y la capacidad de expansión del tejido adiposo (Lee *et al.*, 2010). Está descrito que las ASC están implicadas en la síntesis y el remodelado de la matriz extracelular (Chiellini *et al.*, 2008). Nuestros resultados revelan que las ASC de pacientes obesos presentan una expresión elevada de HAPLN1 (*Hyaluronan and proteoglycan link protein 1*), una proteína que estabiliza la interacción entre dos componentes de la matriz extracelular (Zizola *et al.*, 2007). Todos estos resultados obtenidos el artículo 2 de esta tesis nos muestran que la obesidad mórbida no sólo afecta la capacidad multipotencial de las ASC, sino que induce a las ASC a entrar en un estado de diferenciación hacia el linaje adipocítico.

Después de observar una disminución en la capacidad de diferenciación adipogénica de las ASC de pacientes obesos (artículo 1), podría parecer contradictorio encontrar en estas células una elevada expresión de genes inductores de la adipogénesis (artículo 2). Sin embargo, Roldan y col. han descrito que las ASC de pacientes obesos mórbidos son capaces de iniciar el proceso de adipogénesis pero no son capaces de finalizarlo (Roldan *et al.*, 2011). La adipogénesis es un proceso que se divide en dos fases: la determinación de las ASC al linaje adipocítico, y la diferenciación terminal donde se acaban convirtiendo en adipocitos maduros. Roldan y col. observan que en la última semana del proceso de diferenciación *in vitro*, las ASC de pacientes obesos mórbidos presentan una interrupción en el proceso de maduración que se refleja en una disminución en la captación de lípidos en comparación con las ASC de individuos delgados (Roldan *et al.*, 2011). Estos resultados sugieren que aunque las ASC son capaces de iniciar el proceso de adipogénesis, no son capaces de diferenciarse correctamente a adipocitos maduros y funcionales, pudiendo explicar así los resultados aparentemente contradictorios obtenidos en esta tesis. Por consiguiente, se podría sugerir que aunque la obesidad induce un estado adipogénico en las ASC estimulando la formación de adipocitos lo que contribuiría a la hiperplasia del tejido adiposo, estos “adipocitos” formados no son totalmente funcionales favoreciendo así la hipertrofia del tejido adiposo.

Está ampliamente demostrado que la obesidad se asocia con un estado proinflamatorio crónico de bajo grado, y que la señalización paracrina y autocrina de las células del tejido adiposo obeso

están implicadas en el mantenimiento de este estado proinflamatorio (Wellen and Hotamisligil, 2003). De hecho, se ha descrito que las células del estroma vascular del tejido adiposo juegan un papel muy importante en la producción de citoquinas proinflamatorias en el tejido adiposo de individuos obesos (Fain, 2010). En esta tesis se ha observado que la obesidad incrementa la expresión de citoquinas proinflamatorias en las ASC (artículo 2). Se ha encontrado que la interleuquina-1 β , interleuquina-8 y MCP-1 se encuentran sobreexpresadas en las ASC de pacientes obesos. Estas citoquinas están implicadas en las principales vías inflamatorias, así como se encuentran fuertemente relacionadas con la obesidad, la enfermedad coronaria o la diabetes tipo 1/2 (Kim *et al.*, 2006a; Bruun *et al.*, 2004; Fain, 2006). Además, se ha observado que la expresión de estas citoquinas están relacionadas con los niveles de BMI y la acumulación de factores de riesgo cardiovascular.

Otra citoquina clave implicada en las funciones de migración y anidamiento celular de las ASC es la SDF-1 (Nervi *et al.*, 2006; Kondo *et al.*, 2009). Se ha descrito que los niveles plasmáticos de SDF-1 son inferiores en ratones obesos, así como en adolescentes con un BMI elevado (Jung *et al.*, 2009). En los resultados de esta tesis se ha observado que la expresión de SDF-1 en las ASC está disminuida por la presencia de la obesidad, afectando a la quimiotaxis de las ASC (artículo 2).

Otro gen que aumenta su expresión en las ASC de los pacientes obesos mórbidos es OLR1 (*Oxidized low density lipoprotein receptor 1*) (artículo 2). El receptor OLR-1 se encuentra expresado en tejidos altamente vascularizados, juega un papel importante en el desarrollo de la aterosclerosis, y está sobreexpresado en individuos y animales con factores de riesgo como hipertensión, dislipemias y diabetes (Yan *et al.*, 2011; Chui *et al.*, 2005). Un estudio reciente describe que la interacción de las LDL oxidadas con OLR1 genera especies reactivas de oxígeno que estimulan la expresión de genes proinflamatorios (Dunn *et al.*, 2008). De este modo, la implicación del OLR1 con la obesidad podría estar relacionada con un estado complejo de inflamación y muerte adipocítica. En este estudio hemos identificado que, aunque los niveles de expresión del OLR1 son bajos en las ASC, la obesidad mórbida y la acumulación de factores de riesgo cardiovascular aumentan su expresión.

Se debe destacar también una reducción significativa de la expresión del gen DAPK1 (*Death-associated protein kinase 1*) en las células de los pacientes obesos mórbidos. DAPK1 es el miembro prototipo de la familia de las quinasas asociadas a la muerte celular (DAPK). Sin embargo, la familia de proteínas DAPK también son factores relacionados con la supervivencia celular y la inhibición de la apoptosis como respuesta a las señales de determinadas citoquinas que modulan el balance entre las vías pro-apoptóticas y pro-supervivencia (Lin *et al.*, 2010).

Para estudiar la posible vía de señalización activada en las ASC por la obesidad, se analizaron los genes validados con el la herramienta informática Ingenuity Pathway Analysis. Esta herramienta permite identificar nuevas dianas para su posterior estudio a nivel proteico. Una de las moléculas que potencialmente está implicada en la regulación de varios de los genes con expresión diferencial identificados en esta tesis es Smad3 (*SMAD family member 3*). Al analizar la distribución proteica de Smad3 en las poblaciones celulares estudiadas, se ha encontrado una disminución de la activación de Smad3 en las ASC de los pacientes obesos mórbidos en comparación con las ASC de individuos no-obesos. Curiosamente, se conoce que la vía de señalización de Smad3 está implicada en la inhibición de la diferenciación adipocítica y en el desarrollo de la resistencia a la insulina (Tsurutani *et al.*, 2011; Choy and Derynck, 2003). En esta tesis, gracias a la aproximación hecha con el programa Ingenuity Pathway Analysis, se propone una posible vía de señalización que explicaría el patrón de expresión génico diferencial encontrado entre las ASC de individuos con y sin obesidad (Figura 21).

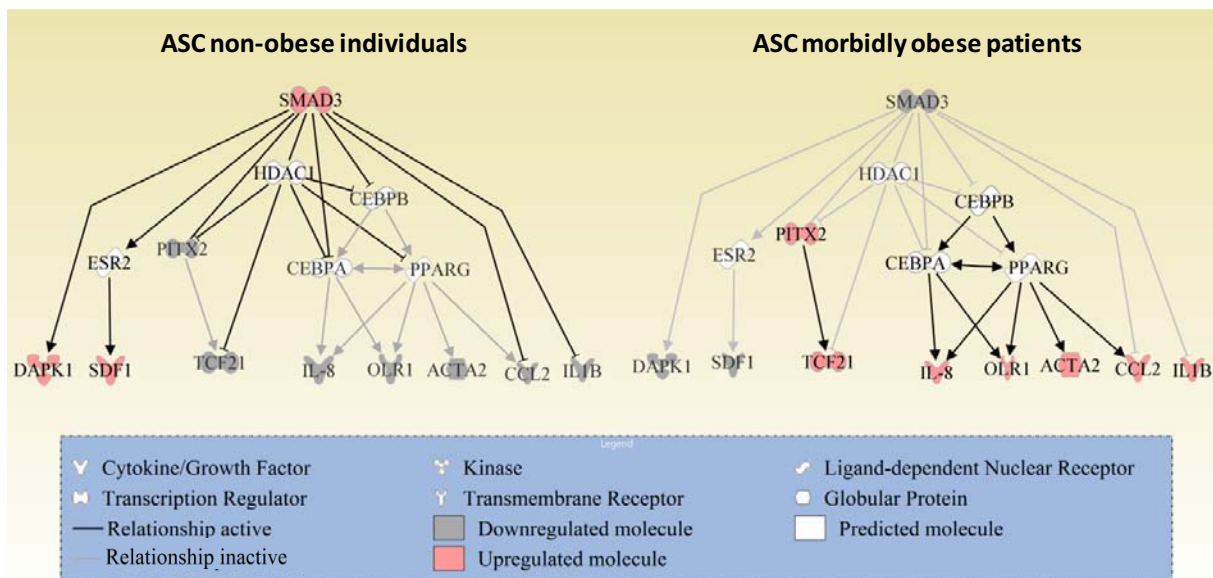


Figura 21. Red de señalización hipotética que proponemos para explicar la regulación diferencial de la expresión génica que hemos encontrado entre las ASC de pacientes obesos y de individuos no-obesos. La vía de señalización se realizó usando el programa IPA.

En resumen, los resultados obtenidos en esta tesis muestran que la obesidad, con y sin factores de riesgo asociados, produce un nicho perjudicial para las ASC. Estos efectos pueden influenciar negativamente en la capacidad regenerativa que tienen las ASC tanto en el propio tejido adiposo, como en la reparación espontánea de pequeñas lesiones que ocurren en el organismo. Además, teniendo en cuenta que las ASC ya se están utilizando en varios ensayos clínicos para la reparación de lesiones isquémicas, fistulas de Crohn o la esclerosis múltiple, los resultados obtenidos en esta tesis indican que la terapia basada en la implantación de ASC autólogas puede no ser exitosa en pacientes

con obesidad y/o factores de riesgo cardiovascular. Un tema que merece futuras investigaciones es determinar si la modificación de estas células mesenquimales ocurre en el propio tejido adiposo dañado o si ya están condicionadas desde la médula ósea de éstos individuos obesos, ya que se cree que éste es el posible nicho original productor de las células mesenquimales.

VI. CONCLUSIONES

A partir de los resultados presentados en esta tesis podemos concluir que:

- 1. La hipoxia favorece el crecimiento de las ASC sin alterar sus marcadores de superficie característicos.**
- 2. La obesidad disminuye el porcentaje de ASC residentes en el tejido adiposo subcutáneo.**
 - El tejido adiposo subcutáneo de pacientes obesos mórbidos presentan un menor número de células CD90 positivas en comparación con el tejido de individuos no-obesos.
- 3. El perfil de marcadores de superficie de las ASC no varía entre individuos con diferente BMI.**
- 4. Las ASC de individuos obesos presentan una alteración de su capacidad proliferativa, multipotencial y angiogénica.**
 - Las ASC de pacientes obesos mórbidos presentan una menor tasa de proliferación que las de individuos no-obesos.
 - La obesidad disminuye la capacidad de diferenciación de las ASC a célula adipocítica y célula endotelial.
 - La obesidad incrementa la expresión del factor antiangiogénico TSP-1 en las ASC.
 - Las ASC de pacientes obesos inhiben la capacidad de formar redes tubulares por parte de las células HUVEC en comparación con las ASC de individuos no obesos.
- 5. La obesidad modifica el transcriptoma de las ASC, promoviendo un fenotipo menos indiferenciado, más adipogénico y más proinflamatorio.**
 - La obesidad disminuye la expresión de genes implicados en el desarrollo embrionario de las ASC.
 - La obesidad aumenta la expresión de genes adipogénicos e inhibe la expresión de genes de la osteoblastogénesis en las ASC.
 - La obesidad incrementa la expresión de genes proinflamatorios en las ASC.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Ackema K. B., and Charite J. Mesenchymal stem cells from different organs are characterized by distinct topographic Hox codes. *Stem Cells Dev* 2008; 17,979-991.
- Akita S., Akino K., Hirano A., et al. Mesenchymal stem cell therapy for cutaneous radiation syndrome. *Health Phys* 2010; 98,858-862.
- Alberti K. G., Zimmet P., and Shaw J. The metabolic syndrome--a new worldwide definition. *Lancet* 2005; 366,1059-1062.
- Alberti K. G., and Zimmet P. Z. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabet Med* 1998; 15,539-553.
- Alegria E., Cordero A., Laclaustra M., et al. [Prevalence of metabolic syndrome in the Spanish working population: MESYAS registry]. *Rev Esp Cardiol* 2005; 58,797-806.
- Alegria Ezquerro E., Castellano Vazquez J. M., and Alegria Barrero A. [Obesity, metabolic syndrome and diabetes: cardiovascular implications and therapy]. *Rev Esp Cardiol* 2008; 61,752-764.
- Allison D. B., and Heshka S. Toward an empirically derived typology of obese persons. *Int J Obes* 1991; 15,741-754.
- An J. J., Han D. H., Kim D. M., et al. Expression and regulation of osteoprotegerin in adipose tissue. *Yonsei Med J* 2007; 48,765-772.
- Aranceta J., Perez Rodrigo C., Serra Majem L., et al. [Prevalence of obesity in Spain: results of the SEEDO 2000 study]. *Med Clin (Barc)* 2003; 120,608-612.
- ATP-III. Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. Executive summary of the third report of the national cholesterol education program (NCEP) expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult treatment panel III). *JAMA* 2001; 285,2486-2497.
- Ayonrinde O. T., Olynyk J. K., Beilin L. J., et al. Gender-specific differences in adipose distribution and adipocytokines influence adolescent nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2011; 53,800-809.
- Badimon L., Oñate B., and Vilahur G. *Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cell and Angiogenesis in Ischemic Heart Disease*. In: Biochemical Basis and Therapeutic Implications of Angiogenesis, 2013, Mehta J. L. and Dhalla N. S. editors. Springer New York; 285-311.
- Bahceci M., Gokalp D., Bahceci S., et al. The correlation between adiposity and adiponectin, tumor necrosis factor alpha, interleukin-6 and high sensitivity C-reactive protein levels. Is adipocyte size associated with inflammation in adults? *J Endocrinol Invest* 2007; 30,210-214.
- Balistreri C. R., Caruso C., and Candore G. The role of adipose tissue and adipokines in obesity-related inflammatory diseases. *Mediators Inflamm* 2010; 2010,802078.
- Balkau B., and Charles M. A. Comment on the provisional report from the WHO consultation. European Group for the Study of Insulin Resistance (EGIR). *Diabet Med* 1999; 16,442-443.
- Balkau B., Deanfield J. E., Despres J. P., et al. International Day for the Evaluation of Abdominal Obesity (IDEA): a study of waist circumference, cardiovascular disease, and diabetes mellitus in 168,000 primary care patients in 63 countries. *Circulation* 2007; 116,1942-1951.
- Barnes L. A., Opitz J. M., and Gilbert-Barnes E. Obesity: genetic, molecular, and environmental aspects. *Am J Med Genet A* 2007; 143A,3016-3034.
- Bel A., Planat-Bernard V., Saito A., et al. Composite cell sheets: a further step toward safe and effective myocardial regeneration by cardiac progenitors derived from embryonic stem cells. *Circulation* 2010; 122,S118-123.
- Benjamini Y., and Hochberg Y. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)* 1995; 57,289-300.
- Boden W. E., O'Rourke R. A., Teo K. K., et al. Optimal medical therapy with or without PCI for stable coronary disease. *N Engl J Med* 2007; 356,1503-1516.
- Bruun J. M., Lihn A. S., Madan A. K., et al. Higher production of IL-8 in visceral vs. subcutaneous adipose tissue. Implication of nonadipose cells in adipose tissue. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2004; 286,E8-13.

- Cai L., Johnstone B. H., Cook T. G., et al. Suppression of hepatocyte growth factor production impairs the ability of adipose-derived stem cells to promote ischemic tissue revascularization. *Stem Cells* 2007; 25,3234-3243.
- Cai X., Lin Y., Hauschka P. V., et al. Adipose stem cells originate from perivascular cells. *Biol Cell* 2011; 103,435-447.
- Cannon B., and Nedergaard J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev* 2004; 84,277-359.
- Canto J. G., Kiefe C. I., Rogers W. J., et al. Number of coronary heart disease risk factors and mortality in patients with first myocardial infarction. *JAMA* 2011; 306,2120-2127.
- Cao Y. Angiogenesis modulates adipogenesis and obesity. *J Clin Invest* 2007; 117,2362-2368.
- Carreau A., El Hafny-Rahbi B., Matejuk A., et al. Why is the partial oxygen pressure of human tissues a crucial parameter? Small molecules and hypoxia. *J Cell Mol Med* 2011; 15,1239-1253.
- Catalina Romero C., Cortes Arcas M. V., Calvo Bonacho E., et al. [Overweight and obesity among physicians in Spain; results from the ICARIA Study]. *Med Clin (Barc)* 2012; 139,84-85.
- Cawthorn W. P., Scheller E. L., and MacDougald O. A. Adipose tissue stem cells meet preadipocyte commitment: going back to the future. *J Lipid Res* 2012; 53,227-246.
- Ciavarella S., Grisendi G., Dominici M., et al. In vitro anti-myeloma activity of TRAIL-expressing adipose-derived mesenchymal stem cells. *Br J Haematol* 2012; 157,586-598.
- Cinti S., Mitchell G., Barbatelli G., et al. Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. *J Lipid Res* 2005; 46,2347-2355.
- Constantin G., Marconi S., Rossi B., et al. Adipose-derived mesenchymal stem cells ameliorate chronic experimental autoimmune encephalomyelitis. *Stem Cells* 2009; 27,2624-2635.
- Cristancho A. G., and Lazar M. A. Forming functional fat: a growing understanding of adipocyte differentiation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2011; 12,722-734.
- Crossno J. T., Jr., Majka S. M., Grazia T., et al. Rosiglitazone promotes development of a novel adipocyte population from bone marrow-derived circulating progenitor cells. *J Clin Invest* 2006; 116,3220-3228.
- Curtis J. P., Selter J. G., Wang Y., et al. The obesity paradox: body mass index and outcomes in patients with heart failure. *Arch Intern Med* 2005; 165,55-61.
- Chandra V., Swetha G., Muthyala S., et al. Islet-like cell aggregates generated from human adipose tissue derived stem cells ameliorate experimental diabetes in mice. *PLoS One* 2011; 6,e20615.
- Chandra V., Swetha G., Phadnis S., et al. Generation of pancreatic hormone-expressing islet-like cell aggregates from murine adipose tissue-derived stem cells. *Stem Cells* 2009; 27,1941-1953.
- Chen J. Z., Zhang F. R., Tao Q. M., et al. Number and activity of endothelial progenitor cells from peripheral blood in patients with hypercholesterolaemia. *Clin Sci (Lond)* 2004; 107,273-280.
- Cherubino M., and Marra K. G. Adipose-derived stem cells for soft tissue reconstruction. *Regen Med* 2009; 4,109-117.
- Chiellini C., Cochet O., Negroni L., et al. Characterization of human mesenchymal stem cell secretome at early steps of adipocyte and osteoblast differentiation. *BMC Mol Biol* 2008; 9,26.
- Choi E. W., Shin I. S., Lee H. W., et al. Transplantation of CTLA4Ig gene-transduced adipose tissue-derived mesenchymal stem cells reduces inflammatory immune response and improves Th1/Th2 balance in experimental autoimmune thyroiditis. *J Gene Med* 2011; 13,3-16.
- Choi E. W., Shin I. S., Park S. Y., et al. Reversal of serologic, immunologic, and histologic dysfunction in mice with systemic lupus erythematosus by long-term serial adipose tissue-derived mesenchymal stem cell transplantation. *Arthritis Rheum* 2012; 64,243-253.
- Choy L., and Derynck R. Transforming growth factor-beta inhibits adipocyte differentiation by Smad3 interacting with CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) and repressing C/EBP transactivation function. *J Biol Chem* 2003; 278,9609-9619.
- Chui P. C., Guan H. P., Lehrke M., et al. PPARgamma regulates adipocyte cholesterol metabolism via oxidized LDL receptor 1. *J Clin Invest* 2005; 115,2244-2256.

- De Ugarte D. A., Morizono K., Elbarbary A., et al. Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow. *Cells Tissues Organs* 2003; 174,101-109.
- Despres J. P. Excess visceral adipose tissue/ectopic fat the missing link in the obesity paradox? *J Am Coll Cardiol* 2011; 57,1887-1889.
- Di Rocco G., Iachininoto M. G., Tritarelli A., et al. Myogenic potential of adipose-tissue-derived cells. *J Cell Sci* 2006; 119,2945-2952.
- Dobbelsteyn C. J., Joffres M. R., MacLean D. R., et al. A comparative evaluation of waist circumference, waist-to-hip ratio and body mass index as indicators of cardiovascular risk factors. The Canadian Heart Health Surveys. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2001; 25,652-661.
- Dominici M., Le Blanc K., Mueller I., et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006; 8,315-317.
- Drenick E. J., Bale G. S., Seltzer F., et al. Excessive mortality and causes of death in morbidly obese men. *JAMA* 1980; 243,443-445.
- Dunn S., Vohra R. S., Murphy J. E., et al. The lectin-like oxidized low-density-lipoprotein receptor: a pro-inflammatory factor in vascular disease. *Biochem J* 2008; 409,349-355.
- Duplus E., Glorian M., and Forest C. Fatty acid regulation of gene transcription. *J Biol Chem* 2000; 275,30749-30752.
- Efimenko A., Starostina E., Kalinina N., et al. Angiogenic properties of aged adipose derived mesenchymal stem cells after hypoxic conditioning. *J Transl Med* 2011; 9,10.
- Ezashi T., Das P., and Roberts R. M. Low O₂ tensions and the prevention of differentiation of hES cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102,4783-4788.
- Fadini G. P., de Kreutzenberg S. V., Coracina A., et al. Circulating CD34+ cells, metabolic syndrome, and cardiovascular risk. *Eur Heart J* 2006a; 27,2247-2255.
- Fadini G. P., Schiavon M., Cantini M., et al. Circulating CD34+ cells, pulmonary hypertension, and myelofibrosis. *Blood* 2006b; 108,1776-1777; author reply 1777.
- Fain J. N. Release of interleukins and other inflammatory cytokines by human adipose tissue is enhanced in obesity and primarily due to the nonfat cells. *Vitam Horm* 2006; 74,443-477.
- Fain J. N. Release of inflammatory mediators by human adipose tissue is enhanced in obesity and primarily by the nonfat cells: a review. *Mediators Inflamm* 2010; 2010,513948.
- Festy F., Hoareau L., Bes-Houtmann S., et al. Surface protein expression between human adipose tissue-derived stromal cells and mature adipocytes. *Histochem Cell Biol* 2005; 124,113-121.
- Flegal K. M., Carroll M. D., Ogden C. L., et al. Prevalence and trends in obesity among US adults, 1999-2008. *JAMA* 2010; 303,235-241.
- Flier J. S., Cook K. S., Usher P., et al. Severely impaired adiponin expression in genetic and acquired obesity. *Science* 1987; 237,405-408.
- Fontaine K. R., Redden D. T., Wang C., et al. Years of life lost due to obesity. *JAMA* 2003; 289,187-193.
- Freedland E. S. Role of a critical visceral adipose tissue threshold (CVATT) in metabolic syndrome: implications for controlling dietary carbohydrates: a review. *Nutr Metab (Lond)* 2004; 1,12.
- Friedl G., Windhager R., Schmidt H., et al. The osteogenic response of undifferentiated human mesenchymal stem cells (hMSCs) to mechanical strain is inversely related to body mass index of the donor. *Acta Orthop* 2009; 80,491-498.
- Frontini A., and Cinti S. Distribution and development of brown adipocytes in the murine and human adipose organ. *Cell Metab* 2010; 11,253-256.
- Fumimoto Y., Matsuyama A., Komoda H., et al. Creation of a rich subcutaneous vascular network with implanted adipose tissue-derived stromal cells and adipose tissue enhances subcutaneous grafting of islets in diabetic mice. *Tissue Eng Part C Methods* 2009; 15,437-444.
- Funato N., Ohyama K., Kuroda T., et al. Basic helix-loop-helix transcription factor epicardin/capsulin/Pod-1 suppresses differentiation by negative regulation of transcription. *J Biol Chem* 2003; 278,7486-7493.

- Galic S., Oakhill J. S., and Steinberg G. R. Adipose tissue as an endocrine organ. *Mol Cell Endocrinol* 2010; 316,129-139.
- Garcia-Diaz D. F., Arellano A. V., Milagro F. I., et al. Glucose and insulin modify thrombospondin 1 expression and secretion in primary adipocytes from diet-induced obese rats. *J Physiol Biochem* 2011; 67,453-461.
- Garcia-Olmo D., Garcia-Arranz M., Herreros D., et al. A phase I clinical trial of the treatment of Crohn's fistula by adipose mesenchymal stem cell transplantation. *Dis Colon Rectum* 2005; 48,1416-1423.
- Garcia-Olmo D., Herreros D., Pascual I., et al. Expanded adipose-derived stem cells for the treatment of complex perianal fistula: a phase II clinical trial. *Dis Colon Rectum* 2009a; 52,79-86.
- Garcia-Olmo D., Herreros D., Pascual M., et al. Treatment of enterocutaneous fistula in Crohn's Disease with adipose-derived stem cells: a comparison of protocols with and without cell expansion. *Int J Colorectal Dis* 2009b; 24,27-30.
- Gesta S., Bezy O., Mori M. A., et al. Mesodermal developmental gene Tbx15 impairs adipocyte differentiation and mitochondrial respiration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108,2771-2776.
- Gesta S., Bluher M., Yamamoto Y., et al. Evidence for a role of developmental genes in the origin of obesity and body fat distribution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103,6676-6681.
- Gesta S., Tseng Y. H., and Kahn C. R. Developmental origin of fat: tracking obesity to its source. *Cell* 2007; 131,242-256.
- Gil A., Olza J., Gil-Campos M., et al. Is adipose tissue metabolically different at different sites? *Int J Pediatr Obes* 2011; 6 Suppl 1,13-20.
- Gimble J. M., Bunnell B. A., and Guilak F. Human adipose-derived cells: an update on the transition to clinical translation. *Regen Med* 2012; 7,225-235.
- Gimble J. M., Katz A. J., and Bunnell B. A. Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circ Res* 2007; 100,1249-1260.
- Gnecchi M., He H., Liang O. D., et al. Paracrine action accounts for marked protection of ischemic heart by Akt-modified mesenchymal stem cells. *Nat Med* 2005; 11,367-368.
- Gonzalez-Rey E., Anderson P., Gonzalez M. A., et al. Human adult stem cells derived from adipose tissue protect against experimental colitis and sepsis. *Gut* 2009; 58,929-939.
- Gonzalez M. A., Gonzalez-Rey E., Rico L., et al. Treatment of experimental arthritis by inducing immune tolerance with human adipose-derived mesenchymal stem cells. *Arthritis Rheum* 2009; 60,1006-1019.
- Goossens G. H., Bizzarri A., Venteclef N., et al. Increased adipose tissue oxygen tension in obese compared with lean men is accompanied by insulin resistance, impaired adipose tissue capillarization, and inflammation. *Circulation* 2011; 124,67-76.
- Grayson W. L., Zhao F., Bunnell B., et al. Hypoxia enhances proliferation and tissue formation of human mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 358,948-953.
- Grayson W. L., Zhao F., Izadpanah R., et al. Effects of hypoxia on human mesenchymal stem cell expansion and plasticity in 3D constructs. *J Cell Physiol* 2006; 207,331-339.
- Grisendi G., Bussolari R., Cafarelli L., et al. Adipose-derived mesenchymal stem cells as stable source of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand delivery for cancer therapy. *Cancer Res* 2010; 70,3718-3729.
- Gronthos S., Zannettino A. C., Hay S. J., et al. Molecular and cellular characterisation of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow. *J Cell Sci* 2003; 116,1827-1835.
- Grundy S. M. Metabolic syndrome: connecting and reconciling cardiovascular and diabetes worlds. *J Am Coll Cardiol* 2006; 47,1093-1100.
- Gupta R. K., Mepani R. J., Kleiner S., et al. Zfp423 expression identifies committed preadipocytes and localizes to adipose endothelial and perivascular cells. *Cell Metab* 2012; 15,230-239.
- Gutierrez-Fisac J. L., Guallar-Castillon P., Leon-Munoz L. M., et al. Prevalence of general and abdominal obesity in the adult population of Spain, 2008-2010: the ENRICA study. *Obes Rev* 2012; 13,388-392.

- Hackam D. G., and Anand S. S. Emerging risk factors for atherosclerotic vascular disease: a critical review of the evidence. *JAMA* 2003; 290,932-940.
- Halberg N., Khan T., Trujillo M. E., et al. Hypoxia-inducible factor 1alpha induces fibrosis and insulin resistance in white adipose tissue. *Mol Cell Biol* 2009; 29,4467-4483.
- Hamed S., Brenner B., Abassi Z., et al. Hyperglycemia and oxidized-LDL exert a deleterious effect on endothelial progenitor cell migration in type 2 diabetes mellitus. *Thromb Res* 2010; 126,166-174.
- Haslam D. W., and James W. P. Obesity. *Lancet* 2005; 366,1197-1209.
- Heida N. M., Muller J. P., Cheng I. F., et al. Effects of obesity and weight loss on the functional properties of early outgrowth endothelial progenitor cells. *J Am Coll Cardiol* 2010; 55,357-367.
- Heiss C., Keymel S., Niesler U., et al. Impaired progenitor cell activity in age-related endothelial dysfunction. *J Am Coll Cardiol* 2005; 45,1441-1448.
- Heitmann B. L., Erikson H., Ellsinger B. M., et al. Mortality associated with body fat, fat-free mass and body mass index among 60-year-old swedish men-a 22-year follow-up. The study of men born in 1913. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2000; 24,33-37.
- Hill J. M., Zalos G., Halcox J. P., et al. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *N Engl J Med* 2003; 348,593-600.
- Himms-Hagen J., Melnyk A., Zingaretti M. C., et al. Multilocular fat cells in WAT of CL-316243-treated rats derive directly from white adipocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000; 279,C670-681.
- Hinck L., Nathke I. S., Papkoff J., et al. Dynamics of cadherin/catenin complex formation: novel protein interactions and pathways of complex assembly. *J Cell Biol* 1994; 125,1327-1340.
- Hoetzer G. L., Van Guilder G. P., Irmiger H. M., et al. Aging, exercise, and endothelial progenitor cell clonogenic and migratory capacity in men. *J Appl Physiol* 2007; 102,847-852.
- Hoffstedt J., Arner E., Wahrenberg H., et al. Regional impact of adipose tissue morphology on the metabolic profile in morbid obesity. *Diabetologia* 2010; 53,2496-2503.
- Hombach-Klonisch S., Panigrahi S., Rashedi I., et al. Adult stem cells and their trans-differentiation potential--perspectives and therapeutic applications. *J Mol Med (Berl)* 2008; 86,1301-1314.
- Horwich T. B., Fonarow G. C., Hamilton M. A., et al. The relationship between obesity and mortality in patients with heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2001; 38,789-795.
- Hossain P., Kavar B., and El Nahas M. Obesity and diabetes in the developing world--a growing challenge. *N Engl J Med* 2007; 356,213-215.
- Hu X., Yu S. P., Fraser J. L., et al. Transplantation of hypoxia-preconditioned mesenchymal stem cells improves infarcted heart function via enhanced survival of implanted cells and angiogenesis. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2008; 135,799-808.
- Hwang J. H., Seok O. S., Song H. R., et al. HOXC10 as a potential marker for discriminating between amnion- and decidua-derived mesenchymal stem cells. *Cloning Stem Cells* 2009; 11,269-279.
- Ibrahim M. M. Subcutaneous and visceral adipose tissue: structural and functional differences. *Obes Rev* 2010; 11,11-18.
- Isakson P., Hammarstedt A., Gustafson B., et al. Impaired preadipocyte differentiation in human abdominal obesity: role of Wnt, tumor necrosis factor-alpha, and inflammation. *Diabetes* 2009; 58,1550-1557.
- Isomaa B., Almgren P., Tuomi T., et al. Cardiovascular morbidity and mortality associated with the metabolic syndrome. *Diabetes Care* 2001; 24,683-689.
- Ito H. Chemokines in mesenchymal stem cell therapy for bone repair: a novel concept of recruiting mesenchymal stem cells and the possible cell sources. *Mod Rheumatol* 2011; 21,113-121.
- James P. T. *Obesity: A Modern Pandemic*. In: Obesity, 2010, Serrano Rios M., Ordovás J. M. and Gutiérrez-Fuentes J. A. editors. Elsevier-Fundación Lilly; 19-34.
- Jaworski K., Sarkadi-Nagy E., Duncan R. E., et al. Regulation of triglyceride metabolism. IV. Hormonal regulation of lipolysis in adipose tissue. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007; 293,G1-4.

- Jung C., Fischer N., Fritzenwanger M., et al. Association of waist circumference, traditional cardiovascular risk factors, and stromal-derived factor-1 in adolescents. *Pediatr Diabetes* 2009; 10,329-335.
- Jurgens W. J., Oedayrajsingh-Varma M. J., Helder M. N., et al. Effect of tissue-harvesting site on yield of stem cells derived from adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Cell Tissue Res* 2008; 332,415-426.
- Kabon B., Nagele A., Reddy D., et al. Obesity decreases perioperative tissue oxygenation. *Anesthesiology* 2004; 100,274-280.
- Kanai H., Matsuzawa Y., Kotani K., et al. Close correlation of intra-abdominal fat accumulation to hypertension in obese women. *Hypertension* 1990; 16,484-490.
- Karelis A. D., Faraj M., Bastard J. P., et al. The metabolically healthy but obese individual presents a favorable inflammation profile. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90,4145-4150.
- Kern S., Eichler H., Stoeve J., et al. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells* 2006; 24,1294-1301.
- Kershaw E. E., and Flier J. S. Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89,2548-2556.
- Khan M., Akhtar S., Mohsin S., et al. Growth factor preconditioning increases the function of diabetes-impaired mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev* 2011; 20,67-75.
- Khan T., Muise E. S., Iyengar P., et al. Metabolic dysregulation and adipose tissue fibrosis: role of collagen VI. *Mol Cell Biol* 2009; 29,1575-1591.
- Kim C. S., Park H. S., Kawada T., et al. Circulating levels of MCP-1 and IL-8 are elevated in human obese subjects and associated with obesity-related parameters. *Int J Obes (Lond)* 2006a; 30,1347-1355.
- Kim J. H., Jung M., Kim H. S., et al. Adipose-derived stem cells as a new therapeutic modality for ageing skin. *Exp Dermatol* 2011a; 20,383-387.
- Kim M., Choi Y. S., Yang S. H., et al. Muscle regeneration by adipose tissue-derived adult stem cells attached to injectable PLGA spheres. *Biochem Biophys Res Commun* 2006b; 348,386-392.
- Kim M., Kim I., Lee S. K., et al. Clinical trial of autologous differentiated adipocytes from stem cells derived from human adipose tissue. *Dermatol Surg* 2011b; 37,750-759.
- Kim S., and Moustaid-Moussa N. Secretory, endocrine and autocrine/paracrine function of the adipocyte. *J Nutr* 2000; 130,3110S-3115S.
- Kirkland J. L., Tchkonja T., Pirtskhalava T., et al. Adipogenesis and aging: does aging make fat go MAD? *Exp Gerontol* 2002; 37,757-767.
- Kode J. A., Mukherjee S., Joglekar M. V., et al. Mesenchymal stem cells: immunobiology and role in immunomodulation and tissue regeneration. *Cytotherapy* 2009; 11,377-391.
- Kolonin M. G., Evans K. W., Mani S. A., et al. Alternative origins of stroma in normal organs and disease. *Stem Cell Res* 2012; 8,312-323.
- Kondo K., Shintani S., Shibata R., et al. Implantation of adipose-derived regenerative cells enhances ischemia-induced angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009; 29,61-66.
- Kucerova L., Altanerova V., Matuskova M., et al. Adipose tissue-derived human mesenchymal stem cells mediated prodrug cancer gene therapy. *Cancer Res* 2007; 67,6304-6313.
- Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227,680-685.
- Lakka H. M., Laaksonen D. E., Lakka T. A., et al. The metabolic syndrome and total and cardiovascular disease mortality in middle-aged men. *JAMA* 2002; 288,2709-2716.
- Lavie C. J., De Schutter A., Patel D., et al. Body composition and coronary heart disease mortality--an obesity or a lean paradox? *Mayo Clin Proc* 2011; 86,857-864.
- Lavie C. J., Milani R. V., and Ventura H. O. Obesity and cardiovascular disease: risk factor, paradox, and impact of weight loss. *J Am Coll Cardiol* 2009; 53,1925-1932.
- Lavie C. J., Osman A. F., Milani R. V., et al. Body composition and prognosis in chronic systolic heart failure: the obesity paradox. *Am J Cardiol* 2003; 91,891-894.

- Lee E. Y., Xia Y., Kim W. S., et al. Hypoxia-enhanced wound-healing function of adipose-derived stem cells: increase in stem cell proliferation and up-regulation of VEGF and bFGF. *Wound Repair Regen* 2009; 17,540-547.
- Lee H. C., An S. G., Lee H. W., et al. Safety and effect of adipose tissue-derived stem cell implantation in patients with critical limb ischemia: a pilot study. *Circ J* 2012; 76,1750-1760.
- Lee K., Kim H., Kim J. M., et al. Systemic transplantation of human adipose-derived stem cells stimulates bone repair by promoting osteoblast and osteoclast function. *J Cell Mol Med* 2011; 15,2082-2094.
- Lee M. J., Wu Y., and Fried S. K. Adipose tissue remodeling in pathophysiology of obesity. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2010; 13,371-376.
- Lendeckel S., Jodicke A., Christophis P., et al. Autologous stem cells (adipose) and fibrin glue used to treat widespread traumatic calvarial defects: case report. *J Craniomaxillofac Surg* 2004; 32,370-373.
- Levi B., James A. W., Nelson E. R., et al. Human adipose derived stromal cells heal critical size mouse calvarial defects. *PLoS One* 2010; 5,e11177.
- Li H., Zhang B., Lu Y., et al. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cell-based liver gene delivery. *J Hepatol* 2011; 54,930-938.
- Liese A. D., Mayer-Davis E. J., and Haffner S. M. Development of the multiple metabolic syndrome: an epidemiologic perspective. *Epidemiol Rev* 1998; 20,157-172.
- Lin Y., Hupp T. R., and Stevens C. Death-associated protein kinase (DAPK) and signal transduction: additional roles beyond cell death. *FEBS J* 2010; 277,48-57.
- Liu J., Divoux A., Sun J., et al. Genetic deficiency and pharmacological stabilization of mast cells reduce diet-induced obesity and diabetes in mice. *Nat Med* 2009; 15,940-945.
- Livak K. J., and Schmittgen T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001; 25,402-408.
- Livingston E. H. Obesity and its surgical management. *Am J Surg* 2002; 184,103-113.
- Locke M. B., and de Chalain T. M. Current practice in autologous fat transplantation: suggested clinical guidelines based on a review of recent literature. *Ann Plast Surg* 2008; 60,98-102.
- Lumeng C. N., Bodzin J. L., and Saltiel A. R. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest* 2007; 117,175-184.
- MacEaney O. J., Kushner E. J., Van Guilder G. P., et al. Endothelial progenitor cell number and colony-forming capacity in overweight and obese adults. *Int J Obes (Lond)* 2009; 33,219-225.
- Madonna R., Renna F. V., Cellini C., et al. Age-dependent impairment of number and angiogenic potential of adipose tissue-derived progenitor cells. *Eur J Clin Invest* 2011; 41,126-133.
- Majka S. M., Barak Y., and Klemm D. J. Concise review: adipocyte origins: weighing the possibilities. *Stem Cells* 2011; 29,1034-1040.
- Manigrasso M. R., Ferroni P., Santilli F., et al. Association between circulating adiponectin and interleukin-10 levels in android obesity: effects of weight loss. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90,5876-5879.
- Mansilla E., Diaz Aquino V., Zambon D., et al. Could metabolic syndrome, lipodystrophy, and aging be mesenchymal stem cell exhaustion syndromes? *Stem Cells Int* 2011; 2011,943216.
- Mazo M., Gavira J. J., Pelacho B., et al. Adipose-derived stem cells for myocardial infarction. *J Cardiovasc Transl Res* 2011; 4,145-153.
- McCarty M. F. A paradox resolved: the postprandial model of insulin resistance explains why gynoid adiposity appears to be protective. *Med Hypotheses* 2003; 61,173-176.
- McIntosh K., Zvonic S., Garrett S., et al. The immunogenicity of human adipose-derived cells: temporal changes in vitro. *Stem Cells* 2006; 24,1246-1253.
- Mesimaki K., Lindroos B., Tornwall J., et al. Novel maxillary reconstruction with ectopic bone formation by GMP adipose stem cells. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2009; 38,201-209.
- Miranville A., Heeschen C., Sengenès C., et al. Improvement of postnatal neovascularization by human adipose tissue-derived stem cells. *Circulation* 2004; 110,349-355.

- Mitchell J. B., McIntosh K., Zvonic S., et al. Immunophenotype of human adipose-derived cells: temporal changes in stromal-associated and stem cell-associated markers. *Stem Cells* 2006; 24,376-385.
- Mizuno H., Tobita M., and Uysal A. C. Concise review: Adipose-derived stem cells as a novel tool for future regenerative medicine. *Stem Cells* 2012; 30,804-810.
- Morgan R. Hox genes: a continuation of embryonic patterning? *Trends Genet* 2006; 22,67-69.
- Morizono K., De Ugarte D. A., Zhu M., et al. Multilineage cells from adipose tissue as gene delivery vehicles. *Hum Gene Ther* 2003; 14,59-66.
- Muehlberg F. L., Song Y. H., Krohn A., et al. Tissue-resident stem cells promote breast cancer growth and metastasis. *Carcinogenesis* 2009; 30,589-597.
- Muller-Ehmsen J., Braun D., Schneider T., et al. Decreased number of circulating progenitor cells in obesity: beneficial effects of weight reduction. *Eur Heart J* 2008; 29,1560-1568.
- Musumeci G., Lo Furno D., Loreto C., et al. Mesenchymal stem cells from adipose tissue which have been differentiated into chondrocytes in three-dimensional culture express lubricin. *Exp Biol Med (Maywood)* 2011; 236,1333-1341.
- Nair S., Lee Y. H., Rousseau E., et al. Increased expression of inflammation-related genes in cultured preadipocytes/stromal vascular cells from obese compared with non-obese Pima Indians. *Diabetologia* 2005; 48,1784-1788.
- Nakagami H., Maeda K., Morishita R., et al. Novel autologous cell therapy in ischemic limb disease through growth factor secretion by cultured adipose tissue-derived stromal cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25,2542-2547.
- Nambu M., Kishimoto S., Nakamura S., et al. Accelerated wound healing in healing-impaired db/db mice by autologous adipose tissue-derived stromal cells combined with atelocollagen matrix. *Ann Plast Surg* 2009; 62,317-321.
- National Institutes of Health N. H., Lung, and Blood Institute. Clinical Guidelines on the Identification, Evaluation, and Treatment of Overweight and Obesity in Adults--The Evidence Report. *Obes Res* 1998; 6 Suppl 2,51S-209S.
- Nervi B., Link D. C., and DiPersio J. F. Cytokines and hematopoietic stem cell mobilization. *J Cell Biochem* 2006; 99,690-705.
- Nishimura S., Manabe I., Nagasaki M., et al. CD8+ effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity. *Nat Med* 2009; 15,914-920.
- Oedayrasingh-Varma M. J., van Ham S. M., Knippenberg M., et al. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cell yield and growth characteristics are affected by the tissue-harvesting procedure. *Cytotherapy* 2006; 8,166-177.
- Ohmura Y., Tanemura M., Kawaguchi N., et al. Combined transplantation of pancreatic islets and adipose tissue-derived stem cells enhances the survival and insulin function of islet grafts in diabetic mice. *Transplantation* 2010; 90,1366-1373.
- Osman A. F., Mehra M. R., Lavie C. J., et al. The incremental prognostic importance of body fat adjusted peak oxygen consumption in chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2000; 36,2126-2131.
- Pearl R. A., Leedham S. J., and Pacifico M. D. The safety of autologous fat transfer in breast cancer: lessons from stem cell biology. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 2012; 65,283-288.
- Permana P. A., Nair S., Lee Y. H., et al. Subcutaneous abdominal preadipocyte differentiation in vitro inversely correlates with central obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2004; 286,E958-962.
- Perrini S., Laviola L., Cignarelli A., et al. Fat depot-related differences in gene expression, adiponectin secretion, and insulin action and signalling in human adipocytes differentiated in vitro from precursor stromal cells. *Diabetologia* 2008; 51,155-164.
- Poirier P., Giles T. D., Bray G. A., et al. Obesity and cardiovascular disease: pathophysiology, evaluation, and effect of weight loss: an update of the 1997 American Heart Association Scientific Statement on Obesity and Heart Disease from the Obesity Committee of the Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism. *Circulation* 2006; 113,898-918.

- Potier E., Ferreira E., Andriamanalijaona R., et al. Hypoxia affects mesenchymal stromal cell osteogenic differentiation and angiogenic factor expression. *Bone* 2007a; 40,1078-1087.
- Potier E., Ferreira E., Meunier A., et al. Prolonged hypoxia concomitant with serum deprivation induces massive human mesenchymal stem cell death. *Tissue Eng* 2007b; 13,1325-1331.
- Puissant B., Barreau C., Bourin P., et al. Immunomodulatory effect of human adipose tissue-derived adult stem cells: comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. *Br J Haematol* 2005; 129,118-129.
- Ramis J. M., Franssen-van Hal N. L., Kramer E., et al. Carboxypeptidase E and thrombospondin-1 are differently expressed in subcutaneous and visceral fat of obese subjects. *Cell Mol Life Sci* 2002; 59,1960-1971.
- Ramunni A., Brescia P., Dambra P., et al. Effect of low-density lipoprotein apheresis on circulating endothelial progenitor cells in familial hypercholesterolemia. *Blood Purif* 2010; 29,383-389.
- Rangappa S., Fen C., Lee E. H., et al. Transformation of adult mesenchymal stem cells isolated from the fatty tissue into cardiomyocytes. *Ann Thorac Surg* 2003; 75,775-779.
- Rasmussen J. G., Frobert O., Pilgaard L., et al. Prolonged hypoxic culture and trypsinization increase the pro-angiogenic potential of human adipose tissue-derived stem cells. *Cytotherapy* 2010; 13,318-328.
- Rehman J., Traktuev D., Li J., et al. Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. *Circulation* 2004; 109,1292-1298.
- Rexrode K. M., Carey V. J., Hennekens C. H., et al. Abdominal adiposity and coronary heart disease in women. *JAMA* 1998; 280,1843-1848.
- Rigotti G., Marchi A., Galie M., et al. Clinical treatment of radiotherapy tissue damage by lipoaspirate transplant: a healing process mediated by adipose-derived adult stem cells. *Plast Reconstr Surg* 2007; 119,1409-1422; discussion 1423-1404.
- Rocchini A. P. Childhood obesity and a diabetes epidemic. *N Engl J Med* 2002; 346,854-855.
- Rodriguez A. M., Elabd C., Amri E. Z., et al. The human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Biochimie* 2005a; 87,125-128.
- Rodriguez A. M., Pisani D., Dechesne C. A., et al. Transplantation of a multipotent cell population from human adipose tissue induces dystrophin expression in the immunocompetent mdx mouse. *J Exp Med* 2005b; 201,1397-1405.
- Rodriguez L. V., Alfonso Z., Zhang R., et al. Clonogenic multipotent stem cells in human adipose tissue differentiate into functional smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103,12167-12172.
- Roldan M., Macias-Gonzalez M., Garcia R., et al. Obesity short-circuits stemness gene network in human adipose multipotent stem cells. *FASEB J* 2011; 25,4111-4126.
- Romero-Corral A., Montori V. M., Somers V. K., et al. Association of bodyweight with total mortality and with cardiovascular events in coronary artery disease: a systematic review of cohort studies. *Lancet* 2006; 368,666-678.
- Ronti T., Lupattelli G., and Mannarino E. The endocrine function of adipose tissue: an update. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2006; 64,355-365.
- Rosova I., Dao M., Capoccia B., et al. Hypoxic preconditioning results in increased motility and improved therapeutic potential of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 2008; 26,2173-2182.
- Ruderman N. B., Schneider S. H., and Berchtold P. The "metabolically-obese," normal-weight individual. *Am J Clin Nutr* 1981; 34,1617-1621.
- Rupnick M. A., Panigrahy D., Zhang C. Y., et al. Adipose tissue mass can be regulated through the vasculature. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99,10730-10735.
- Rutkowski J. M., Davis K. E., and Scherer P. E. Mechanisms of obesity and related pathologies: the macro- and microcirculation of adipose tissue. *FEBS J* 2009; 276,5738-5746.
- Rytka J. M., Wueest S., Schoenle E. J., et al. The portal theory supported by venous drainage-selective fat transplantation. *Diabetes* 2011; 60,56-63.

- Salas-Salvado J., Rubio M. A., Barbany M., et al. [SEEDO 2007 Consensus for the evaluation of overweight and obesity and the establishment of therapeutic intervention criteria]. *Med Clin (Barc)* 2007; 128,184-196; quiz 181 p following 200.
- Salgado A. J., Reis R. L., Sousa N. J., et al. Adipose tissue derived stem cells secretome: soluble factors and their roles in regenerative medicine. *Curr Stem Cell Res Ther* 2010; 5,103-110.
- Schaffler A., and Buchler C. Concise review: adipose tissue-derived stromal cells--basic and clinical implications for novel cell-based therapies. *Stem Cells* 2007; 25,818-827.
- Schenkeveld L., Magro M., Oemrawsingh R. M., et al. The influence of optimal medical treatment on the 'obesity paradox', body mass index and long-term mortality in patients treated with percutaneous coronary intervention: a prospective cohort study. *BMJ Open* 2012; 2,e000535.
- Scherberich A., Di Maggio N. D., and McNagny K. M. A familiar stranger: CD34 expression and putative functions in SVF cells of adipose tissue. *World J Stem Cells* 2013; 5,1-8.
- Schipper B. M., Marra K. G., Zhang W., et al. Regional anatomic and age effects on cell function of human adipose-derived stem cells. *Ann Plast Surg* 2008; 60,538-544.
- Schipper H. S., Prakken B., Kalkhoven E., et al. Adipose tissue-resident immune cells: key players in immunometabolism. *Trends Endocrinol Metab* 2012; 23,407-415.
- Seale P., Bjork B., Yang W., et al. PRDM16 controls a brown fat/skeletal muscle switch. *Nature* 2008; 454,961-967.
- Sepe A., Tchkonja T., Thomou T., et al. Aging and regional differences in fat cell progenitors - a mini-review. *Gerontology* 2011; 57,66-75.
- Sheehan M. T., and Jensen M. D. Metabolic complications of obesity. Pathophysiologic considerations. *Med Clin North Am* 2000; 84,363-385, vi.
- Sheng L., Yang M., Li H., et al. Transplantation of adipose stromal cells promotes neovascularization of random skin flaps. *Tohoku J Exp Med* 2011; 224,229-234.
- Shepherd P. R., Gnudi L., Tozzo E., et al. Adipose cell hyperplasia and enhanced glucose disposal in transgenic mice overexpressing GLUT4 selectively in adipose tissue. *J Biol Chem* 1993; 268,22243-22246.
- Shi H., Kokoeva M. V., Inouye K., et al. TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. *J Clin Invest* 2006; 116,3015-3025.
- Shih H. P., Gross M. K., and Kiousi C. Cranial muscle defects of Pitx2 mutants result from specification defects in the first branchial arch. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104,5907-5912.
- Siiteri P. K. Adipose tissue as a source of hormones. *Am J Clin Nutr* 1987; 45,277-282.
- Smart N., and Riley P. R. The stem cell movement. *Circ Res* 2008; 102,1155-1168.
- Sordella R., Jiang W., Chen G. C., et al. Modulation of Rho GTPase signaling regulates a switch between adipogenesis and myogenesis. *Cell* 2003; 113,147-158.
- Spalding K. L., Arner E., Westermarck P. O., et al. Dynamics of fat cell turnover in humans. *Nature* 2008; 453,783-787.
- Stolzing A., Jones E., McGonagle D., et al. Age-related changes in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells: consequences for cell therapies. *Mech Ageing Dev* 2008; 129,163-173.
- Suganami T., Nishida J., and Ogawa Y. A paracrine loop between adipocytes and macrophages aggravates inflammatory changes: role of free fatty acids and tumor necrosis factor alpha. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25,2062-2068.
- Sun K., Kusminski C. M., and Scherer P. E. Adipose tissue remodeling and obesity. *J Clin Invest* 2011; 121,2094-2101.
- Tamarat R., Silvestre J. S., Le Ricousse-Roussanne S., et al. Impairment in ischemia-induced neovascularization in diabetes: bone marrow mononuclear cell dysfunction and therapeutic potential of placenta growth factor treatment. *Am J Pathol* 2004; 164,457-466.
- Tang Q. Q., and Lane M. D. Adipogenesis: from stem cell to adipocyte. *Annu Rev Biochem* 2012; 81,715-736.

- Tang W., Zeve D., Suh J. M., et al. White fat progenitor cells reside in the adipose vasculature. *Science* 2008; 322,583-586.
- Tarnok A., Ulrich H., and Bocsi J. Phenotypes of stem cells from diverse origin. *Cytometry A* 2010; 77,6-10.
- Tchkonia T., Giorgadze N., Pirtskhalava T., et al. Fat depot-specific characteristics are retained in strains derived from single human preadipocytes. *Diabetes* 2006; 55,2571-2578.
- Tchkonia T., Lenburg M., Thomou T., et al. Identification of depot-specific human fat cell progenitors through distinct expression profiles and developmental gene patterns. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007; 292,E298-307.
- Tchoukalova Y., Koutsari C., and Jensen M. Committed subcutaneous preadipocytes are reduced in human obesity. *Diabetologia* 2007; 50,151-157.
- Tepper O. M., Galiano R. D., Capla J. M., et al. Human endothelial progenitor cells from type II diabetics exhibit impaired proliferation, adhesion, and incorporation into vascular structures. *Circulation* 2002; 106,2781-2786.
- Tesauro M., Canale M. P., Rodia G., et al. Metabolic syndrome, chronic kidney, and cardiovascular diseases: role of adipokines. *Cardiol Res Pract* 2011; 2011,653182.
- Thangarajah H., Vial I. N., Chang E., et al. IFATS collection: Adipose stromal cells adopt a proangiogenic phenotype under the influence of hypoxia. *Stem Cells* 2009; 27,266-274.
- Thesleff T., Lehtimäki K., Niskakangas T., et al. Cranioplasty with adipose-derived stem cells and biomaterial: a novel method for cranial reconstruction. *Neurosurgery* 2011; 68,1535-1540.
- Tobita M., Uysal A. C., Ogawa R., et al. Periodontal tissue regeneration with adipose-derived stem cells. *Tissue Eng Part A* 2008; 14,945-953.
- Trayhurn P., and Wood I. S. Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. *Br J Nutr* 2004; 92,347-355.
- Trujillo M. E., and Scherer P. E. Adipose tissue-derived factors: impact on health and disease. *Endocr Rev* 2006; 27,762-778.
- Tsurutani Y., Fujimoto M., Takemoto M., et al. The roles of transforming growth factor-beta and Smad3 signaling in adipocyte differentiation and obesity. *Biochem Biophys Res Commun* 2011; 407,68-73.
- Uysal A. C., and Mizuno H. Differentiation of adipose-derived stem cells for tendon repair. *Methods Mol Biol* 2011; 702,443-451.
- Van Harmelen V., Rohrig K., and Hauner H. Comparison of proliferation and differentiation capacity of human adipocyte precursor cells from the omental and subcutaneous adipose tissue depot of obese subjects. *Metabolism* 2004; 53,632-637.
- van Harmelen V., Skurk T., Rohrig K., et al. Effect of BMI and age on adipose tissue cellularity and differentiation capacity in women. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2003; 27,889-895.
- Vanikar A. V., Dave S. D., Thakkar U. G., et al. Cotransplantation of adipose tissue-derived insulin-secreting mesenchymal stem cells and hematopoietic stem cells: a novel therapy for insulin-dependent diabetes mellitus. *Stem Cells Int* 2010; 2010,582382.
- Varma V., Yao-Borengasser A., Bodles A. M., et al. Thrombospondin-1 is an adipokine associated with obesity, adipose inflammation, and insulin resistance. *Diabetes* 2008; 57,432-439.
- Vasa M., Fichtlscherer S., Aicher A., et al. Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease. *Circ Res* 2001; 89,E1-7.
- Verburg F. A. J., van Beek A. P., Sluiter W. J., et al. Metabolically healthy obese: a prospective study on risk of development of cardiovascular events. *Endocrinology* 2010; .
- Villaret A., Galitzky J., Decaunes P., et al. Adipose tissue endothelial cells from obese human subjects: differences among depots in angiogenic, metabolic, and inflammatory gene expression and cellular senescence. *Diabetes* 2010; 59,2755-2763.
- Virtanen K. A., Lidell M. E., Orava J., et al. Functional brown adipose tissue in healthy adults. *N Engl J Med* 2009; 360,1518-1525.

- Wagner W., Wein F., Seckinger A., et al. Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. *Exp Hematol* 2005; 33,1402-1416.
- Wajchenberg B. L. Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome. *Endocr Rev* 2000; 21,697-738.
- Walter M., Liang S., Ghosh S., et al. Interleukin 6 secreted from adipose stromal cells promotes migration and invasion of breast cancer cells. *Oncogene* 2009; 28,2745-2755.
- Walton C., Lees B., Crook D., et al. Body fat distribution, rather than overall adiposity, influences serum lipids and lipoproteins in healthy men independently of age. *Am J Med* 1995; 99,459-464.
- Wang M., Crisostomo P. R., Herring C., et al. Human progenitor cells from bone marrow or adipose tissue produce VEGF, HGF, and IGF-I in response to TNF by a p38 MAPK-dependent mechanism. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2006; 291,R880-884.
- Wang S., Soni K. G., Semache M., et al. Lipolysis and the integrated physiology of lipid energy metabolism. *Mol Genet Metab* 2008; 95,117-126.
- Weisberg S. P., McCann D., Desai M., et al. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* 2003; 112,1796-1808.
- Wellen K. E., and Hotamisligil G. S. Obesity-induced inflammatory changes in adipose tissue. *J Clin Invest* 2003; 112,1785-1788.
- Wellen K. E., and Hotamisligil G. S. Inflammation, stress, and diabetes. *J Clin Invest* 2005; 115,1111-1119.
- White U. A., and Stephens J. M. The gp130 receptor cytokine family: regulators of adipocyte development and function. *Curr Pharm Des* 2011; 17,340-346.
- Winer S., Chan Y., Paltser G., et al. Normalization of obesity-associated insulin resistance through immunotherapy. *Nat Med* 2009; 15,921-929.
- World Health Organization. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation. *World Health Organ Tech Rep Ser* 2000; 894,1-253.
- Wronska A., and Kmiec Z. Structural and biochemical characteristics of various white adipose tissue depots. *Acta Physiol (Oxf)* 2012; 205,194-208.
- Xu Y., Liu L., Li Y., et al. Myelin-forming ability of Schwann cell-like cells induced from rat adipose-derived stem cells in vitro. *Brain Res* 2008; 1239,49-55.
- Yan M., Mehta J. L., and Hu C. LOX-1 and obesity. *Cardiovasc Drugs Ther* 2011; 25,469-476.
- Yanez R., Lamana M. L., Garcia-Castro J., et al. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have in vivo immunosuppressive properties applicable for the control of the graft-versus-host disease. *Stem Cells* 2006; 24,2582-2591.
- Yang Y. C., Liu B. S., Shen C. C., et al. Transplantation of adipose tissue-derived stem cells for treatment of focal cerebral ischemia. *Curr Neurovasc Res* 2011; 8,1-13.
- Yang Z., Chen L., Su C., et al. Impaired endothelial progenitor cell activity is associated with reduced arterial elasticity in patients with essential hypertension. *Clin Exp Hypertens* 2010; 32,444-452.
- Yue W. S., Wang M., Yan G. H., et al. Smoking is associated with depletion of circulating endothelial progenitor cells and elevated pulmonary artery systolic pressure in patients with coronary artery disease. *Am J Cardiol* 2010; 106,1248-1254.
- Yusuf S., Hawken S., Ounpuu S., et al. Obesity and the risk of myocardial infarction in 27,000 participants from 52 countries: a case-control study. *Lancet* 2005; 366,1640-1649.
- Yusuf S., Hawken S., Ounpuu S., et al. Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. *Lancet* 2004; 364,937-952.
- Zaim M., Karaman S., Cetin G., et al. Donor age and long-term culture affect differentiation and proliferation of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Ann Hematol* 2012; 91,1175-1186.

- Zhang D. Z., Gai L. Y., Liu H. W., et al. Transplantation of autologous adipose-derived stem cells ameliorates cardiac function in rabbits with myocardial infarction. *Chin Med J (Engl)* 2007; 120,300-307.
- Zhang Y., Daquinag A., Traktuev D. O., et al. White adipose tissue cells are recruited by experimental tumors and promote cancer progression in mouse models. *Cancer Res* 2009; 69,5259-5266.
- Zhang Y., Proenca R., Maffei M., et al. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 1994; 372,425-432.
- Zhang Y. Y., Li X., Qian S. W., et al. Down-Regulation of Type I Runx2 Mediated by Dexamethasone Is Required for 3T3-L1 Adipogenesis. *Mol Endocrinol* 2012.
- Zhu M., Kohan E., Bradley J., et al. The effect of age on osteogenic, adipogenic and proliferative potential of female adipose-derived stem cells. *J Tissue Eng Regen Med* 2009; 3,290-301.
- Zhu W., Chen J., Cong X., et al. Hypoxia and serum deprivation-induced apoptosis in mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 2006; 24,416-425.
- Zimmerlin L., Donnenberg V. S., Rubin J. P., et al. Mesenchymal markers on human adipose stem/progenitor cells. *Cytometry A* 2013; 83,134-140.
- Zimmet P., Magliano D., Matsuzawa Y., et al. The metabolic syndrome: a global public health problem and a new definition. *J Atheroscler Thromb* 2005; 12,295-300.
- Zizola C. F., Julianelli V., Bertolesi G., et al. Role of versican and hyaluronan in the differentiation of 3T3-L1 cells into preadipocytes and mature adipocytes. *Matrix Biol* 2007; 26,419-430.
- Zuk P. A., Zhu M., Ashjian P., et al. Human Adipose Tissue Is a Source of Multipotent Stem Cells. *Mol. Biol. Cell* 2002; 13,4279-4295.
- Zuk P. A., Zhu M., Mizuno H., et al. Multilineage Cells from Human Adipose Tissue: Implications for Cell-Based Therapies. *Tissue Engineering* 2001; 7,211-228.