



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



Departamento de Cirugía, Obstetricia y Ginecología.
Facultad de Medicina. Universidad de Málaga.

TEJIDO ADIPOSO TÍMICO HUMANO COMO FUENTE DE ANGIOGÉNESIS

**Memoria de Tesis presentada por la licenciada en Biología
LETICIA I. COÍN ARAGÜEZ para optar al grado de Doctor
por la Universidad de Málaga.**

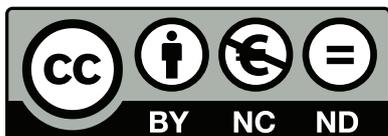
Málaga, 2014



**Publicaciones y
Divulgación Científica**

AUTOR: Leticia I. Coín Aragüez

EDITA: Publicaciones y Divulgación Científica. Universidad de Málaga



Esta obra está sujeta a una licencia Creative Commons:

Reconocimiento - No comercial - SinObraDerivada (cc-by-nc-nd):

[Http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/es](http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/es)

Cualquier parte de esta obra se puede reproducir sin autorización pero con el reconocimiento y atribución de los autores.

No se puede hacer uso comercial de la obra y no se puede alterar, transformar o hacer obras derivadas.

Esta Tesis Doctoral está depositada en el Repositorio Institucional de la Universidad de Málaga (RIUMA): riuma.uma.es

Don **FRANCISCO JOSÉ TINAHONES MADUEÑO**. Doctor en Medicina,

CERTIFICA:

Que **LETICIA I. COÍN ARAGÜEZ**, licenciada en Biología por la Universidad de Málaga, ha realizado bajo su dirección y en el Laboratorio de Investigación del Complejo Hospitalario de Málaga (Virgen de la Victoria) del Instituto de Investigación Biomédica de Málaga (IBIMA) el trabajo titulado **“TEJIDO ADIPOSEO TÍMICO HUMANO COMO FUENTE DE ANGIOGÉNESIS”**, reuniendo el mismo el contenido y rigor científicos necesarios para optar al grado de Doctor.

Y para que así conste, firma el presente certificado en Málaga a 14 de Julio de 2014.

Dr. Francisco J. Tinahones Madueño

Director

Doña **RAJAA EL BEKAY**. Doctor en Biología,

CERTIFICA:

Que **LETICIA I. COÍN ARAGÜEZ**, licenciada en Biología por la Universidad de Málaga, ha realizado bajo su dirección y en el Laboratorio de Investigación del Complejo Hospitalario de Málaga (Virgen de la Victoria) del Instituto de Investigación Biomédica de Málaga (IBIMA) el trabajo titulado **“TEJIDO ADIPOSEO TÍMICO HUMANO COMO FUENTE DE ANGIOGÉNESIS”**, reuniendo el mismo el contenido y rigor científicos necesarios para optar al grado de Doctor.

Y para que así conste, firma el presente certificado en Málaga a 14 de Julio de 2014.

Dr. **RAJAA EL BEKAY**

Directora

MANUEL GARCÍA CABALLERO. Catedrático de Cirugía del Departamento de Cirugía, Obstetricia y Ginecología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Málaga y Coordinador del Programa de Doctorado de “Nutrición y Cirugía: Adquisición de Capacidades Técnicas, de Investigación y Desarrollo Profesional”,

CERTIFICA:

Que **LETICIA I. COÍN ARAGÜEZ**, licenciada en Biología por la Universidad de Málaga, ha realizado el trabajo titulado “**TEJIDO ADIPOSEO TÍMICO HUMANO COMO FUENTE DE ANGIOGÉNESIS**”, reuniendo el mismo el contenido y rigor científicos necesarios para optar al grado de Doctor.

Y para que así conste, firma el presente certificado en Málaga a 14 de Julio de 2014.

MANUEL GARCÍA CABALLERO

Tutor

“Debes tener mucha paciencia -respondió el zorro-. Te sentarás al principio un poco lejos de mí, así, en el suelo; yo te miraré con el rabillo del ojo y tú no me dirás nada. El lenguaje es fuente de malos entendidos. Pero cada día podrás sentarte un poco más cerca...”

Le Petit Prince.

Antoine de Saint-Exupéry.

AGRADECIMIENTOS

A Paco, por dejarme ser una de sus “chicas”. Por su pasión por la investigación y su trabajo. Por plantearme retos laborales haciéndome crecer como investigadora día a día.

A Rajaa. Por todo el conocimiento y trabajo enseñados. Por mostrarme el camino y hacerme ver que siempre hay una solución por muy oscuras que se vean las cosas. Por su lucha constante para conseguir cualquier objetivo. Por ser un ejemplo a seguir como investigadora y como persona. Por tantas charlas, tanto a nivel laboral, como a nivel personal. Por abrirme las puertas de su casa, permitirme disfrutar de su familia y deleitarme con sus exquisitas comidas. Porque su Alá y mi Dios quisieron (o quiso) que nos cruzáramos y fue todo un acierto... Simplemente, porque es genial.

A Manuel G. Caballero, por sus palabras de ánimo para continuar en el trabajo cada vez que nos vemos. Por sus charlas formativas durante las clases de Doctorado y ser un buen tutor.

A Julián Salas. Por la colaboración prestada y acordarse de nosotras en cada operación. Por ser una persona amable y atenta y tratarnos siempre con afecto.

A mis compañeros de laboratorio: Mercedes, por compartir confidencias investigadoras, por resolver mis dudas informáticas, por las noches de hoteles y por hacerse un hueco entre mis amigas; Lourdes, por sus consejos durante los desayunos; Eduardo, por su paciencia; Juan, por su vitalidad al llevar “to pa'lante”; Said, por trabajar sin descanso; Adriana, por sus ganas de continuar aprendiendo; Dani, por ver el mundo desde su particular perspectiva; Will, por

poner ritmo cubano a los experimentos; Inma, por su impecable administración y simpatía; Fernando, por coordinar todo; Maribel, por conocer tantas técnicas; Rosa, por decir las cosas como son; Mora, porque aunque esté lejos, aún se hace notar; Lola, que me enseñó en mis inicios; Mar, por ser un torbellino de energía; Isa, por ser la última pero estupenda incorporación al grupo; Vanessa, por aportar coherencia a las cosas; Cristina, por hablar sin reparo; Luis, por ser un permanente libro de consulta; Ángela, por tomar las riendas oncológicas; Rosario, por su bonita sonrisa. M^a Fernanda, por las historietas con sus niñas; Carmen, porque es una tímida, pero gran persona; Encarni, por su limpio toque de dulzura; Josefina, por la información nutricional, por sus meriendas hipocalóricas, por sus chistes y chorradas y por ser una fantástica amiga.

A mis amigos, por comprender mis nervios, respetar mis decisiones y apoyarme para sacar el trabajo adelante. A mi Meli, por ser un pilar fundamental en los años universitarios y convertirse en compañía imprescindible. A mi Alice, por su organización en el laboratorio, por solucionar los más inimaginables problemas técnicos, por inventar protocolos que nadie cumple y por, a pesar de los sinsabores, realizar su labor incondicionalmente; por alguna que otra cerveza, con y sin; por sus risas y sus llantos; por dejarme formar parte de sus locuras y hacerme creer que mis consejos de verdad son útiles.

A mi familia política. Por acogerme y hacerme sentir una más de los suyos. El cariño de Tita Ana no se puede expresar con palabras y la imaginación de Sergio siempre me hace reír. A Antonio, porque sus piropos me alegran los días y a Maruchi, que sé que desde el cielo también me ha cogido cariño y me cuida como sólo los de allá arriba saben hacerlo.

A Juan, mi hermano. Sin sus ironías no sabría vivir. Porque tiene valores difíciles de encontrar en las personas y es bueno, noble y cariñoso. Porque es el pequeño y siempre me veré en la obligación de cuidarlo... y esa obligación me encanta. A Sofía, por aguantarlo... que no es poco.

A Juan y Patricia, mis padres. Porque me dieron la vida. Por educarme y formarme como la persona que soy. Por hacerme crecer interiormente. Por su dedicación, esfuerzo, empeño, tesón y perseverancia. Por su ciego apoyo. Porque no concibo una realidad sin que estén a mi lado.

A María, mi pitufilla, mi princesa preciosa... porque cuando me sonrío le encuentro sentido a la vida. Porque gracias a ella he descubierto lo que es querer y amar sin condiciones... porque por ella siento necesaria mi existencia.

Y por supuesto, a José Antonio, mi pirata de barba rojo fuego, mi amigo, mi compañero, mi consejero, mi amante... mi marido. Por estar a mi lado en todo momento, apoyándome y animándome a afrontar cualquier reto que se me plantee. Por hacerme ver las cosas con optimismo y de colores vivos. Por trazar ese hilo invisible que dirige mi vida. Por sacarme una sonrisa del llanto y hacerme llorar de risa. Por acompañarme en el camino, impulsarme en los baches, sosegarme en la inquietud, dar calma a mis pesadillas, ahuyentar mis miedos y compartir mis alegrías. Porque él es mi mundo.

Gracias.

ABREVIATURAS UTILIZADAS EN EL TEXTO Y FIGURAS

AdipoQ: Adiponectina.	ISCT: Sociedad Internacional de Terapia Celular.
ADRP: Proteína relacionada con la diferenciación adiposa.	LDL: Lipoproteínas de baja densidad.
ADSC: células del estroma derivadas de tejido adiposo.	MMP: Metaloproteinasa de matriz extracelular.
AMPc: Adenosín 5 monofosfato.	MSC: Células madre mesenquimales.
Ang: Angiopoyetina.	NPY: Neuropeptido Y.
ARN: Ácido ribonucleíco.	PBS: Tampón fosfato salino.
CABG: injerto de bypass artero-coronario.	PDGF: Factor de crecimiento derivado de plaquetas.
CAM: Membrana corioalantoidea.	PLGF: Factor de crecimiento placentario.
C/EBP: Proteínas de unión al potenciador.	PPAR: Receptor activador de la proliferación de los peroxisomas.
CEC: Circulación extracorpórea.	qRT-PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa a Tiempo Real.
CFU-F: Unidades formadoras de colonias fibroblastoides.	RXR: Receptor del ácido 9-cis-retinoico.
CPB: Bypass cardiopulmonar.	SVF: Fracción del estroma vascular del tejido adiposo.
COX-2: Ciclooxygenasa-2.	TA: Tejido adiposo.
EPC: Células progenitoras endoteliales derivadas de sangre.	TAS: Tejido adiposo subcutáneo.
FABP: Proteína de unión a ácidos grasos.	TAT: Tejido adiposo de timo.
FGF: Factor de crecimiento fibroblástico.	TAV: Tejido adiposo visceral.
Hb1Ac: Hemoglobina glicosilada.	TF: Factor tisular.
HDL: Lipoproteínas de alta densidad.	TGF: Factor de crecimiento transformante.
HGF: Factor de crecimiento de hepatocitos.	Tie2: Receptor para angiopoyetina 1.
HIF-1: Factor inducible por hipoxia.	TNF: Factor de necrosis tumoral.
HO-1: Hemooxigenasa-1.	UCP1: Proteína desacopladora tipo 1.
HUVEC: Células endoteliales de cordón umbilical humano.	uPA: Urokinasa.
IGF: Factor de crecimiento insulínico.	VEGF: Factor de crecimiento del endotelio vascular.
IL: Interleuquina.	VEGF-R: Receptor del factor de crecimiento del endotelio vascular.
IMC: Índice de masa corporal.	

ÍNDICE

⌘ INTRODUCCIÓN:

▪ Glándula Timo.....	1
▪ Tejido Adiposo.....	5
▪ Adipogénesis.....	11
▪ Mecanismos Moleculares Mediadores De La Adipogénesis en el Tejido Adiposo Blanco.....	15
▪ Angiogénesis.....	21
▪ Relación Adipogénesis/Angiogénesis.....	32
▪ Cardiopatía Isquémica.....	36
▪ Células Madre Mesenquimales.....	41
▪ Tejido Adiposo y Células Madre Mesenquimales.....	45
▪ Estudios Previos del Grupo de Investigación.....	56

⌘ HIPÓTESIS..... 60

⌘ OBJETIVOS..... 61

⌘ MATERIALES Y MÉTODOS:

○ *Estudio 1: Análisis y comparación de los niveles de expresión de parámetros endoteliales, angiogénicos y adipogénicos en TAT y TAS en relación con el incremento de la edad.*

▪ Pacientes y Recogida de Tejido Adiposo.....	62
▪ Extracción de ARN.....	63
▪ Cuantificación de ARN.....	66
▪ Retrotranscripción (RT).....	67
▪ Cuantificación de ADNc.....	69
▪ Reacción en Cadena de la Polimerasa a Tiempo Real (RT-PCR).....	70
▪ Extracción Proteica.....	72
▪ Cuantificación de Proteínas. Método Bradford.....	76

▪ Análisis por Inmunodetección (Western Blot).....	78
▪ Aislamiento y Expansión Celular.....	87
▪ Citometría de Flujo.....	89
▪ Ensayo In Vivo en Membrana Corioalantoidea de Codorniz (Chorioalantoic Membrane – CAM).....	92
▪ Análisis Estadístico.....	93
○ <i>Estudio 2: Caracterización de células mesenquimales procedentes de TAT y TAS en relación con el incremento de la edad.</i>	
▪ Pacientes y Recogida de Tejido Adiposo.....	94
▪ Aislamiento y Expansión Celular.....	96
▪ Ensayo de Proliferación Celular (Curvas de Crecimiento Celular).....	96
▪ Ensayo de Unidades Formadoras de Colonias Fibroblastoides (CFU-F assay).....	98
▪ Citometría de Flujo.....	99
▪ Ensayos de Diferenciación: Diferenciación Adipogénica, Diferenciación Osteogénica y Diferenciación Endotelial.....	100
▪ Extracción de ARN.....	103
▪ Cuantificación de ARN.....	106
▪ Retrotranscripción (RT).....	106
▪ Cuantificación de ADNc.....	109
▪ Reacción en Cadena de la Polimerasa a Tiempo Real (RT-PCR).....	109
▪ Formación de Túbulos por Células Endoteliales Procedentes de la Sena Safena Humana (HSaVEC) en Medio Condicionado Generado por Cultivo de Células Procedentes de la SVF de TAT y TAS.....	111
▪ Análisis Estadístico.....	112
○ <i>Consentimiento Informado.</i>	
▪ Información al Paciente.....	114
▪ Consentimiento por Escrito del Paciente.....	116

RESULTADOS:

- *Estudio 1: Análisis y comparación de los niveles de expresión de parámetros endoteliales, angiogénicos y adipogénicos en TAT y TAS en relación con el incremento de la edad.*
 - Variables Clínicas y Biológicas de Ambos Grupos de Pacientes (Mediana Edad - 45/65 años - y Tercera Edad - ≥ 70 años -).....118
 - Comparación de los Niveles de Expresión Génica y Proteica de VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C y VEGF-D de Tejido Adiposo Tímico y Subcutáneo Entre Pacientes Adultos de Mediana y Tercera Edad Con Cardiomiopatía Isquémica.....119
 - Comparación de los Niveles de Expresión Génica y Proteica de los Marcadores Endoteliales de Tejido Adiposo Tímico y Subcutáneo Entre Pacientes Adultos de Mediana y Tercera Edad con Cardiomiopatía Isquémica.....122
 - Comparación de los Niveles de Expresión Génica y Proteica de los Marcadores Adipogénicos (PPAR γ 2, ADRP y FABP4) de Tejido Adiposo Tímico y Subcutáneo Entre Pacientes Adultos de Mediana y Tercera Edad con Cardiomiopatía Isquémica.....127
 - Análisis de Correlación.....129
 - Ensayo *in vivo* en Membrana Corioalantoidea de Codorniz (Chorioalantoic Membrane – CAM).....132

- *Estudio 2: Caracterización de células mesenquimales procedentes de TAT y TAS en relación con el incremento de la edad.*
 - Variables Clínicas y Biológicas de Ambos Grupos de Pacientes (Mediana Edad - 45/65 años - y Tercera Edad - ≥ 70 años -).....134
 - Ensayo de Proliferación Celular (Curva de Crecimiento Celular) de Células Mesenquimales Procedentes de la SVF de TAT y TAS.....135

<ul style="list-style-type: none"> ▪ Ensayo de Unidades Formadoras de Colonias Fibroblastoides (CFU-F assay)..... 	137
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Caracterización Inmunofenotípica de las Células de la SVF Mediante Citometría de Flujo 	139
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Evaluación Cualitativa y Cuantitativa del Potencial de Diferenciación Adipogénico y Osteogénico 	142
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Evaluación Cuantitativa del Potencial de Diferenciación Endotelial..... 	146
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Comparación de los Niveles de Expresión Génica de Marcadores Adipogénicos (FASN, ADRP y CEBPα), Marcadores Osteogénicos (ALPL) y Marcadores Endoteliales (CD31, CD309, VWF y CD34) de Tejido Adiposo Tímico y Subcutáneo Entre Pacientes Adultos de Mediana y Tercera Edad con Cardiomiopatía Isquémica..... 	148
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Formación de Túbulos por Células Endoteliales Procedentes de la Vena Safena Humana (HSaVEC) En Medio Condicionado Generado Por Cultivo de Células Procedentes de la SVF Derivadas de TAT y TAS 	151
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Análisis de Correlación..... 	153
∅ DISCUSIÓN.....	154
∅ CONCLUSIONES.....	176
∅ BIBLIOGRAFÍA.....	178
∅ FINANCIACIÓN Y PRODUCCIÓN.....	193
∅ PUBLICACIONES CIENTÍFICAS.....	196

INTRODUCCIÓN

GLÁNDULA TIMO

El timo de los mamíferos es una glándula endocrina con forma de pirámide que se localiza en el tórax, caudal al tiroides, dorsal al esternón y ventral al corazón y los grandes vasos. Pertenece al sistema linfático, concretamente es un órgano linfoide primario o central, donde las células del sistema inmune se diferencian a partir de células madre, proliferan y maduran hacia células con capacidad efectora. Desempeña un importante papel en el desarrollo de la inmunidad mediada por células, principalmente, produciendo glóbulos blancos para formar y reforzar el sistema inmunológico, sobre todo durante la gestación y en la infancia, hasta la pubertad. Tras alcanzar su máximo en la pubertad, su actividad inmunológica principal cesa y se convierte en residual pasando a ser principalmente tejido adiposo (Gruver A.L. y col.; 2007). El timo es esencial para el normal desarrollo del sistema inmune; la eliminación de este órgano meses antes del nacimiento puede evitar el desarrollo de toda inmunidad celular, lo cual provoca un serio deterioro de las defensas inmunológicas que dependen de los linfocitos T derivados del timo (Miller J.F. y col.; 2002).

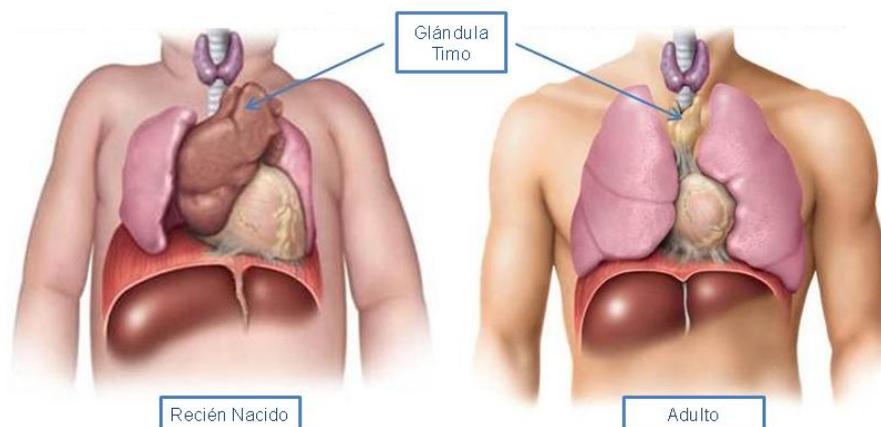


Figura 1. Ubicación de la glándula timo en el cuerpo humano. Diferencia de tamaño entre recién nacidos y adultos. Fuente: McGrawHill Companies.

Esta glándula se encuentra encapsulada y formada por 2 lóbulos principales unidos y compuestos por lobulillos que están separados por trabéculas de tejido conjuntivo. Podemos diferenciar en él dos zonas, una cortical externa donde residen timocitos relativamente inmaduros (expresan marcadores de superficie CD7, CD2, CD1), y una zona medular interna donde existen timocitos maduros (expresan CD44 y CD4 -en el caso de Linfocitos T reguladores- o CD8 -en el caso de Linfocitos T citotóxicos-). Además, en el timo predominan las células epiteliales, necesarias para la diferenciación de las células pre-tímicas en linfocitos T maduros, y pueden encontrarse células dendríticas, macrófagos, fibroblastos, eosinófilos y linfocitos B.

El timo es altamente activo durante la vida embrionaria, alcanza su mayor actividad a los 6 meses de edad y continúa su crecimiento en la infancia alcanzando su talla máxima absoluta durante la pubertad (unos 40-50 grs. a los 12 años de edad). A partir de entonces, en un momento aún no bien definido, cesa el crecimiento y comienza una involución fisiológica gradual en la zona cortical, llamada “involución natural”, con el consiguiente descenso en la producción de linfocitos, quedando pequeños vestigios en el adulto. En la vejez, la glándula es a menudo más pequeña que en el nacimiento, contando con unos 15 grs. aproximadamente.

Esta involución con la edad es mostrada por un descenso en el peso total del órgano, atrofia del tejido linfoide asociado (el tejido linfoide que persiste mantiene sólo algo de función) y reemplazamiento por tejido adiposo maduro (Hale L.P. y col.; 2004). Se piensa que la involución tímica es el

resultado de los altos niveles circulantes de hormonas sexuales, principalmente durante la pubertad, la menor población de células precursoras de médula ósea en la glándula y los cambios que se producen en el microambiente tímico (Caruso C. y col.; 2009), pero aunque esté aceptado que diversos factores contribuyan a la involución que sufre al timo en relación con la edad, muy poco se conoce sobre los mecanismos involucrados en el proceso.

Se han descrito diversos cambios asociados con la involución tímica. Entre los más estudiados se encuentra la reducción en el número total de linfocitos T vírgenes (expresan el fenotipo CD45RA+, CD62L+ CD27+, CD28+ y CD11a+) por disminución en la timopoyesis, y el incremento en el número de linfocitos T de memoria, como una consecuencia de la experiencia inmunológica que se adquiere durante la vida. El efecto de una reducción de linfocitos T vírgenes en sangre periférica es el empobrecimiento en el repertorio total de linfocitos T, lo cual puede llevar a una limitada respuesta hacia los nuevos antígenos (Sansoni P. y col.; 2008). Sin embargo un proceso que comienza durante el desarrollo no es considerado por muchos investigadores como parte de un proceso de envejecimiento, sino que puede tratarse de un proceso adaptativo con desconocidas e importantes funciones. Así, algunas de las razones de la involución del timo se han buscado en términos de desarrollo. Las hipótesis propuestas para explicar la involución del timo hacen referencia a beneficios energéticos (George A.J. y col.; 1996), protección contra leucemia (Dorshkind K. y col.; 2009) puesto que una disminución de afluencia de progenitores celulares linfoides del hueso marrón está asociada con el riesgo de desarrollar leucemia de células T (Martins, V. C. y col.; 2012),

autoinmunidad, ya que defectos en el desarrollo de células T y su interacción permiten el envejecimiento prematuro del sistema inmune y pueden conducir al desarrollo de enfermedades autoinmunes (Prelog M. y col.; 2006), o mecanismo de selección de células T positivas (Dowling M.R. y col.; 2009). A pesar de que en todo caso la capacidad de producir células T disminuye de manera drástica con la edad, en personas de edad avanzada se retiene algún grado de la función tímica residual (Douek D.C. y col.; 2000).

La involución natural fisiológica relacionada con la edad y su irreversibilidad están asociadas con una alteración de la inmunidad celular, por esta razón, todos los estudios llevados a cabo sobre la involución del timo adulto se han centrado principalmente en su aspecto inmunológico, en la senescencia inmune y en varias enfermedades asociadas que se relacionan con la atrofia e involución del tejido (Chinen J. y col.; 2006). De hecho, en los últimos años se ha incrementado el interés en la posibilidad de restaurar la actividad timopoyética debido a la observación de que diversas situaciones médicas afectan a la actividad fisiológica del timo (Castle S.C. y col.; 2000), no resultando nunca lo suficientemente interesante su estudio como potencial fuente de factores humorales y/o angiogénicos, ni como potencial fuente de células madre mesenquimales con posible uso para terapia celular, todo ello como alternativa a las tradicionales fuentes de tejido adiposo utilizadas que ya están siendo destinadas a dicha finalidad (Han J. y col.; 2010). Incluso tampoco se han estudiado las posibles características diferenciales que pueda presentar con respecto a otros tejidos adiposos.

TEJIDO ADIPOSO

El tejido adiposo es una variedad especializada de tejido conjuntivo que está formado por células adiposas o adipocitos y un componente estromático/vascular en el que residen los preadipocitos; también posee abundante irrigación sanguínea. Los adipocitos se unen entre sí mediante fibras reticulares de colágeno tipo III formando lobulillos que a su vez constituyen lóbulos adiposos. Los adipocitos, con un tamaño de 10 a 200 micras, son células redondeadas especializadas en almacenar lípidos o grasas.

En el cuerpo humano hay una distribución genérica de tejido adiposo aunque existen lugares donde éste se acumula en mayor cantidad, como es por ejemplo el caso de la región perirrenal, en el tejido conjuntivo que rodea a ciertos órganos, alrededor de las vísceras abdominales, en las glándulas mamarias o en la región glútea.

Tradicionalmente, al tejido adiposo se le ha atribuido el papel de reservorio energético: almacén de triacilglicéridos durante la alimentación y liberación de ácidos grasos durante el ayuno para proporcionar la energía necesaria en otros tejidos. Sin embargo, el papel metabólico de este tejido es mucho más complejo. Es necesario para mantener la homeostasis de la glucosa en el organismo y parece estar involucrado en diferentes procesos inflamatorios. Actualmente se le atribuyen importantes funciones fisiológicas ya que secreta numerosas proteínas, denominadas adipocitoquinas o adipocinas, que participan en la regulación tanto autocrina como paracrina del propio tejido,

así como en la función de órganos distales como músculo, páncreas, hígado o cerebro (Trayhurn P. y col.; 2001). Algunas de estas proteínas son citoquinas inflamatorias o participan en la respuesta inmune, otras juegan un papel en el metabolismo lipídicos, y otras están involucradas en la homeostasis vascular. Alteraciones en la producción de adipocinas se relacionan con estados de insulino-sensibilidad o disfunción endotelial, evidenciando la relación entre la regulación de la función endotelial y las adipocinas. (de Carvalho M.H. y col.; 2006) Existen considerables evidencias de la relación entre la alteración de la producción de ciertos factores adipocíticos y sus consecuencias fisiopatológicas como complicaciones metabólicas y cardiovasculares relacionadas de la obesidad (Trayhurn P. y col.; 2001), poniendo de manifiesto que el tejido adiposo no es una simple reserva de energía.

Existen dos tipos principales de tejido adiposo. Presentan diferencias respecto a su morfología celular, vascularización e inervación, coloración en fresco, localización y función.

- Tejido adiposo marrón o pardo (grasa parda). Tejido multilocular ya que los lípidos se almacenan en forma de pequeñas vesículas distribuidas de forma regular por todo el citoplasma. Los adipocitos marrones son de menor tamaño que los blancos y tienen forma poliédrica; se unen entre sí por un fino tejido conjuntivo formando lobulillos entre los que abundan los capilares sanguíneos y las terminaciones nerviosas. Su nombre deriva de la coloración de los adipocitos que es debida a la citocromooxidasa presente en la gran cantidad de mitocondrias esféricas

con crestas largas y tubulares que posee, las cuales expresan altas cantidades de UCP1 (uncoupling protein 1), proteínas desacoplantes que producen fosforilación oxidativa desacopladora, lo que da lugar a disipación de energía en forma de calor. Por tanto, él es el encargado de la termogénesis.

- Tejido adiposo blanco o amarillo (grasa blanca). Tejido unilocular ya que los lípidos se almacenan en el interior celular en una única gota lipídica de gran tamaño que ocupa hasta el 95% del volumen total celular, desplazando los restantes componentes citoplasmáticos, muy escasos, hacia la periferia. Los adipocitos uniloculares son muy grandes. Alrededor de cada adipocito existe una capa fina de glicocalix y una fina red de fibras reticulares, así como abundantes vasos sanguíneos de pequeño calibre (arteriolas, vénulas y capilares). Estos adipocitos adoptan forma esférica aislados, pero en los lobulillos se aprecian poliédricos. Este Tejido Adiposo es el más abundante del organismo humano adulto. En él se pone de manifiesto el tejido adiposo como órgano productor de sustancias con acción endocrina, paracrina y autocrina.
- En los últimos años se habla de un tercer tipo de adipocitos tras comprobar que ciertos “paquetes” de genes con capacidad termogénica pueden desarrollarse en el tejido adiposo blanco en respuesta a determinados estímulos (Vitali, A. y col.; 2012). A los adipocitos con esta capacidad se les ha llamado “beige”. Son muy similares a los adipocitos

del tejido adiposo marrón ya que poseen un elevado contenido mitocondrial, gotas lipídicas multiloculares y expresan genes específicos de grasa marrón, por ejemplo, UCP-1 (Harms M. y col.; 2013). En los depósitos de tejido adiposo subcutáneos de ratón estas células no derivan de los mismos precursores embriogénicos de los que derivan los adipocitos marrones (Seale P. y col.; 2008) ni expresan altos niveles de UCP1 y otros genes termogénicos bajo condiciones basales, sino de forma estimulada por ciertos activadores tales como los agonistas del receptor β -adrenérgico o el receptor de peroxisoma- γ activado por el proliferador (PPAR- γ) (Petrovic, N. y col.; 2010. Wu J. y col.; 2013) sugiriendo esto que pueden considerarse distintos tipos celulares. Estos adipocitos “intermedios” entre los blancos y los marrones están normalmente localizados en las zonas de transición de los dos tejidos adiposos clásicos (Vitali A. y col.; 2012).

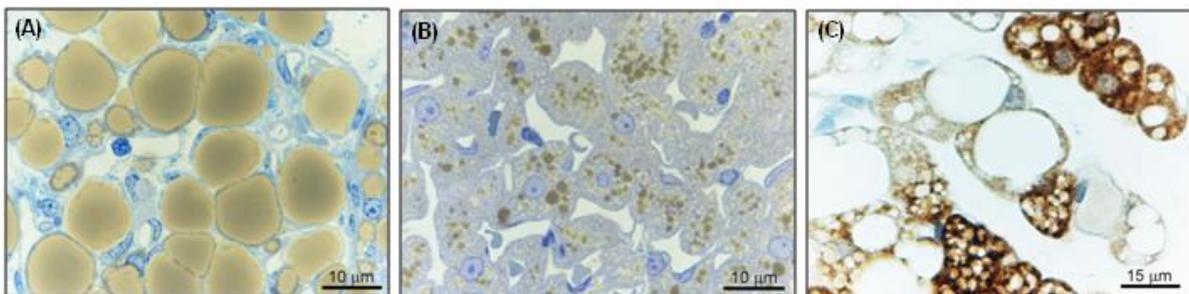


Figura 2. Características morfológicas de los adipocitos blancos, marrones y beige. A) Aspecto histológico del Tejido Adiposo blanco a microscopía óptica. B) Aspecto histológico del Tejido Adiposo marrón a microscopía óptica. C) Una inmunohistoquímica para UCP1 muestra los clásicos adipocitos marrones de color marrón oscuro y los adipocitos beige con una tinción más débil. Fuente: Smorlesi A. y col.; 2012.

En ratas se ha observado una progresiva reducción del número de adipocitos marrones y un simultáneo incremento en el número de adipocitos blancos en los depósitos subcutáneos con la edad. La aclimatación al frío de ratas adultas restablece la cantidad de adipocitos marrones a los niveles de animales jóvenes (Morrioni M. y col.; 1995). En humanos el tejido adiposo marrón parece ser reemplazado por el blanco con la edad. La exposición al frío y a reducida iluminación en humanos parecen tener similares efectos a los observados en ratas (Nedergaard J. y col.; 2010).

En condiciones normales el 80% del tejido adiposo está localizado en la hipodermis constituyendo el tejido adiposo subcutáneo (TAS), mientras que el tejido adiposo visceral (TAV) representa menos del 20%. El TAV está constituido por adipocitos de tamaño más reducido, con menor capacidad de almacenamiento, más vascularizado, con mayor inervación simpática y mayor actividad metabólica.

En el crecimiento postnatal o aumento del tejido adiposo se hallan implicados dos procesos:

- Crecimiento hiperplásico. Consiste en el incremento del número de adipocitos debido a la mitosis de los preadipocitos mesenquimáticos que, tras una serie de pasos de diferenciación en la que participa toda una cascada de factores de transcripción específicos, pasan a adipoblastos y finalmente a adipocitos. Prevalece durante la infancia y juventud.

- Crecimiento hipertrófico. Consiste en el aumento del tamaño de los adipocitos por almacén de mayor cantidad de lípidos. Los adipocitos pueden duplicar o triplicar su tamaño normal. Este mecanismo es el que básicamente se produce en la etapa adulta.

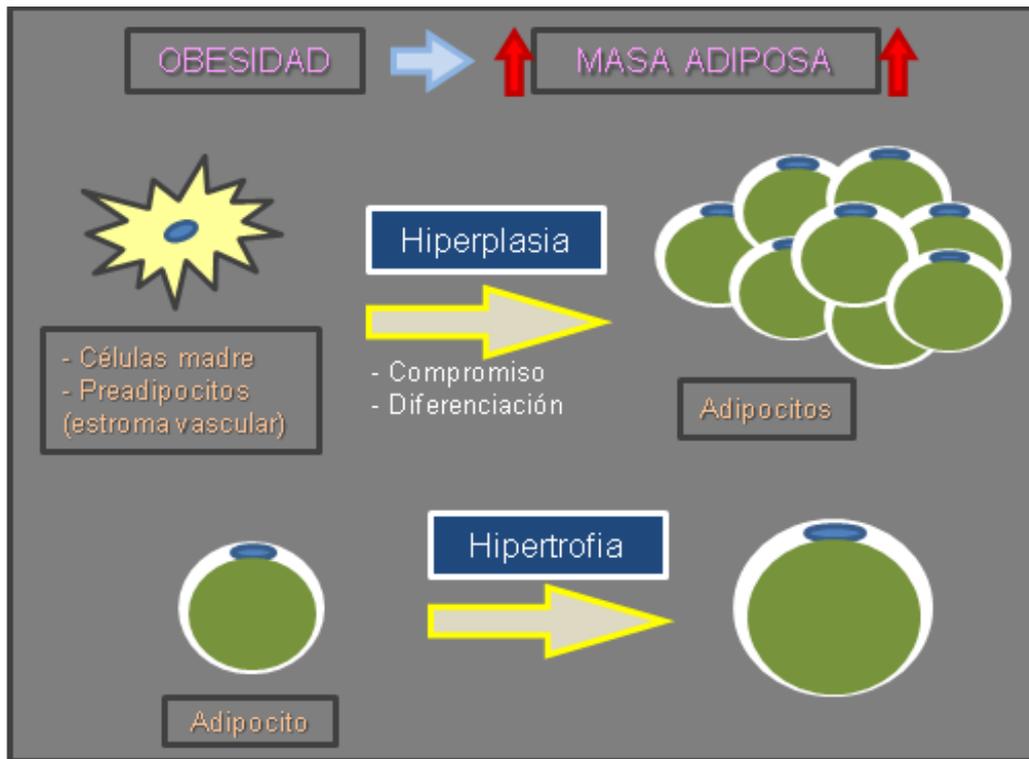


Figura 3. Hiperplasia e hipertrofia. La hiperplasia e hipertrofia son los procesos responsables del incremento de masa del tejido adiposo, el cual se relaciona con obesidad. En la hiperplasia del tejido adiposo contribuyen tanto el reclutamiento de células madre multipotentes hacia el linaje adipogénico para producir nuevos adipocitos como la expansión mitótica clonal de los preadipocitos existentes durante la adipogénesis. Las células madre multipotentes y los preadipocitos están presentes en la fracción del estroma vascular (SVF) del tejido adiposo. El incremento de la lipogénesis y el almacenamiento de ácidos grasos en las gotas de grasa uniloculares permiten la hipertrofia de los adipocitos maduros. Fuente: Otto T.C. y col.; 2005.

ADIPOGÉNESIS

Adipogénesis es el proceso de diferenciación celular por el cual, los preadipocitos se convierten en adipocitos. Este paso de preadipocitos hacia adipocitos se produce durante toda la vida. Se han desarrollado numerosos modelos de cultivo celular para poder estudiar el compromiso y la posterior diferenciación de los preadipocitos hacia adipocitos. (Otto T.C. y col.; 2005). El linaje de células adiposas surge de una población de células madre multipotentes de origen mesodérmico. Estas células precursoras residen en el estroma vascular del tejido adiposo y están sometidas a un proceso de múltiples etapas que comprende un paso inicial de compromiso en el que las células se restringen hacia el linaje de adipocitos a pesar de que aún no expresen marcadores de diferenciación terminal. Estas células pluripotentes también tienen el potencial de comprometerse, y por tanto diferenciarse, hacia miocitos, osteocitos y condrocitos (Huang H. y col.; 2009), sin embargo, una vez comprometidas, los preadipocitos pueden ser inducidos a diferenciarse hacia adipocitos, pero no hacia otros tipos celulares.

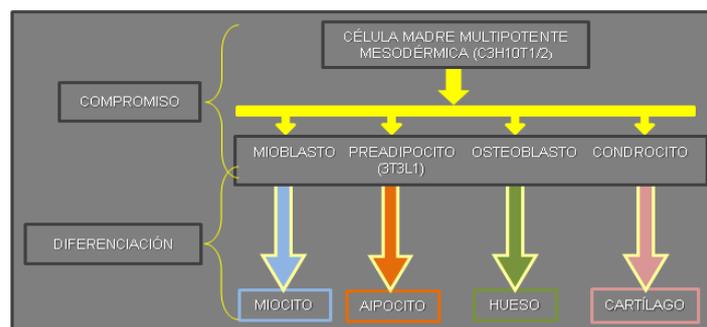


Figura 4. El compromiso de las células madre multipotentes de origen mesodérmico da lugar a múltiples tipos celulares con diferentes características. Cuando reciben el estímulo apropiado, las células madre multipotentes mesodérmicas originan cuatro grandes linajes: mioblastos, preadipocitos, osteoblastos y condroblastos, los cuales experimentan diferenciación hacia las células que producirán tejido muscular, adiposo, óseo y cartilaginoso, respectivamente. Fuente: Otto T.C. y col.; 2005.

El siguiente paso tras el compromiso es la activación de una red de factores de transcripción que dan lugar al fenotipo de adipocitos. Es probable que los factores que inician este proceso sean secretados por las células de la propia población del estroma vascular y/o por los adipocitos sometidos a hipertrofia. Se han identificado *ex vivo* factores que permiten el compromiso de las células madre mesenquimales al linaje adiposo (BMPs: bone morphogenetic proteins, como BMP2 y BMP4), así como a los linajes de cartílago o de hueso, todo ello dependiendo de las condiciones del cultivo, pero aún no se han determinado los mecanismos moleculares por los cuales están reguladas estas rutas (Otto T.C. y col.; 2005).

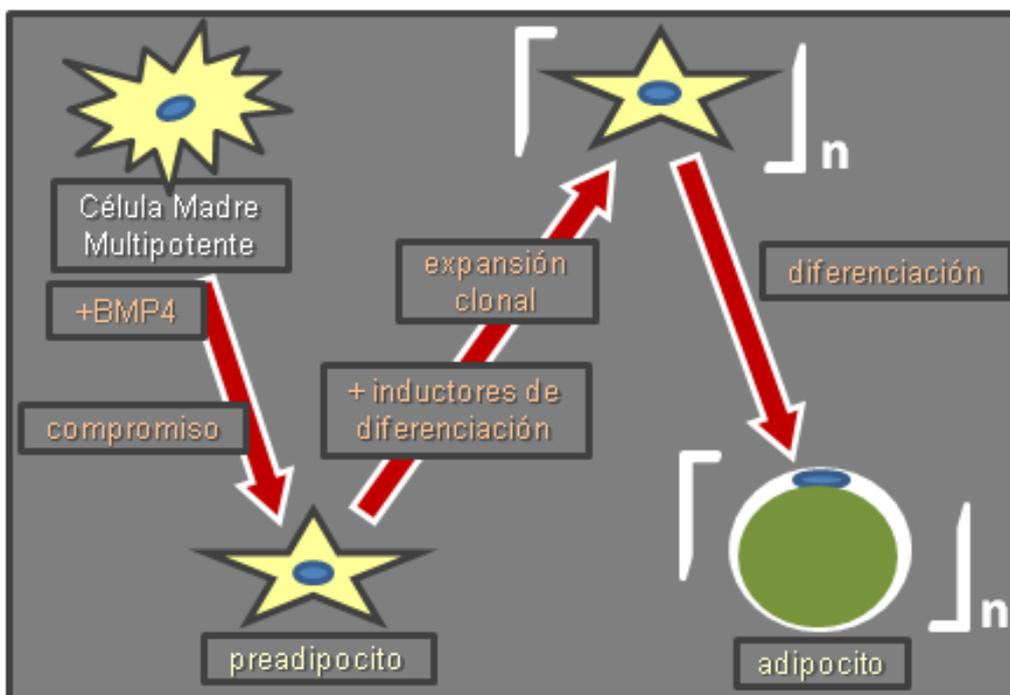


Figura 5. Principales fases del desarrollo de adipocitos a partir de células madre multipotentes. El compromiso de las células madre multipotentes hacia el linaje adiposo para producir preadipocitos es iniciado por BMP4. La exposición de los preadipocitos a los inductores de diferenciación apropiados desencadena unas dos rondas de expansión clonal mitótica, incrementándose de este modo el número celular unas cuatro veces. Seguida a la expansión clonal mitótica tiene lugar la diferenciación terminal, en la cual, la gran familia de genes de los adipocitos se activa transcripcionalmente. Fuente: Otto T.C. y col.; 2005.

Antes de la diferenciación, las líneas celulares de preadipocitos son morfológicamente similares a las células preadiposas fibroblásticas del estroma del tejido adiposo. Sin embargo, tras la inducción de diferenciación, estas células pierden su carácter fibroblástico, asumen un aspecto redondeado y adquieren las características morfológicas y bioquímicas de los adipocitos.

Numerosos estudios han demostrado que inhibir la expansión mitótica clonal de los preadipocitos, impide la adipogénesis. La evidencia más convincente de ello reside en experimentos en los que la interrupción de la señalización del factor de transcripción C/EBP β , y por tanto, el consiguiente bloqueo de la expansión clonal mitótica, impidió que se diera el proceso de adipogénesis (Tang Q.Q. y col.; 2003. Zhang. y col.; 2004).

Cuando las células completan su expansión clonal, entran en una etapa de crecimiento detenido, que es apropiada para la posterior diferenciación (Scott R.E. y col.; 1982). En preadipocitos 3T3-L1 este proceso se caracteriza por cambios en la expresión de inhibidores de ciclinas dependientes de kinasas (Morrison R.F. y col.; 1999). Incluso una vez iniciada la diferenciación, los preadipocitos conservan la capacidad de desdiferenciarse y volver a entrar en mitosis. Sin embargo, una vez que han salido de la etapa de crecimiento detenido, llegan a un punto poco definido en el que llegan a comprometerse hacia la diferenciación terminal, la cual está mantenida por la expresión, al menos en parte, de dos familias de factores de transcripción. (Tontonoz P. y col.; 1994).

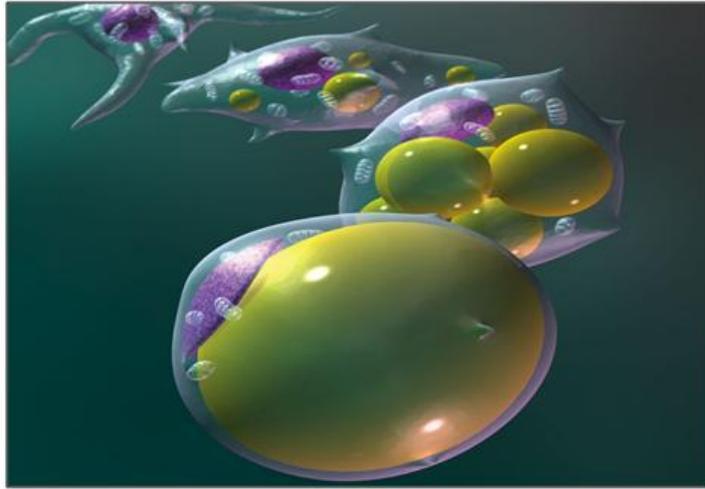


Figura 6. Dibujo representativo del proceso de adipogénesis desde un preadipocito a un adipocito maduro. El adipocito ya maduro se presenta como una célula de gran tamaño con forma esférica, cuyo citoplasma se encuentra ocupado por una gran vacuola lipídica que desplaza al núcleo y demás orgánulos a la periferia. Fuente: Illustration and Animation; G. Carlson.

Se conoce bien que la expansión del tejido adiposo está relacionada con el desarrollo de su sistema vascular. Hay estudios que demuestran que el tejido adiposo humano de los adultos con obesidad severa es capaz de inducir la angiogénesis (creación de nuevos vasos sanguíneos a partir de los ya preexistentes) mediante reclutamiento de sus propias células endoteliales (Ledoux S. y col.; 2008), por tanto, angiogénesis y adipogénesis son dos procesos vinculados funcionalmente. Durante la embriogénesis, el desarrollo del tejido adiposo y su vascularización están temporal y espacialmente relacionados (Hausman G.J. y col.; 2004). En modelos animales de obesidad genética e inducida la expansión del tejido adiposo está asociada con una angiogénesis muy activa, mientras que la inhibición de la angiogénesis evita el desarrollo del tejido adiposo (Rupnick M.A. y col.; 2002. Bråkenhielm E. y col.; 2004. Kolonin M.G. y col.; 2004). La relación entre los adipocitos y las células endoteliales implica numerosos factores paracrinos asociados con la

angiogénesis y/o con la diferenciación del tejido adiposo así como interacciones célula-célula; también se ha observado que las células madre derivadas de tejido adiposo humano pueden diferenciarse hacia células adiposas o hacia células endoteliales (Cao Y. y col.; 2005. Miranville A. y col.; 2004. Planat-Benard V. y col.; 2004). Numerosos estudios han demostrado que el tejido adiposo puede estimular la angiogénesis en modelos fisiológicos tales como la membrana corioalantoidea (CAM) de pollo y la cornea de conejo, o en modelos fisiopatológicos como la cicatrización de heridas o la revascularización de tejidos isquémicos (Cao Y. y col.; 2007. Miranville A. y col.; 2004. Planat-Benard V. y col.; 2004. Rehman J. y col.; 2004. Sumi M. y col.; 2007). El tejido adiposo produce diversos factores que están involucrados en la angiogénesis (TNF- α , VEGF...); así mismo, factores implicados en la regulación adipocitaria (leptina, adiponectina...) regulan la angiogénesis (Ledoux S. y col.; 2008).

MECANISMOS MOLECULARES MEDIADORES DE LA ADIPOGÉNESIS EN EL TEJIDO ADIPOSO BLANCO

En los últimos años se han estudiado ampliamente los mecanismos celulares y moleculares de la diferenciación de adipocitos o adipogénesis usando cultivos de preadipocitos. Los preadipocitos sometidos a crecimiento detienen y consecuentemente terminan su diferenciación en adipocitos, debido a un drástico incremento en la expresión de genes de adipogénesis entre los que se incluyen proteínas de unión de ácidos grasos y enzimas

metabolizadoras de lípidos. Varias hormonas y factores de crecimiento afectan también de manera positiva o negativa a este proceso y componentes involucrados en las interacciones célula-célula o célula-matriz extracelular son clave en su regulación (Gregoire F.M. y col.; 1998).

Como factores de crecimiento principales implicados en la compleja red de diferenciación de preadipocitos en adipocitos encontramos a PPAR γ y C/EBP α :

Receptor activador de la proliferación de los peroxisomas (PPAR: peroxisome proliferator-activated receptors). Los PPARs son factores de transcripción pertenecientes a la superfamilia de los receptores nucleares activados por ligando que regulan de manera directa la expresión de un gran número de genes involucrados en la diferenciación de adipocitos, el metabolismo de lípidos y carbohidratos y la síntesis de adipocinas, por lo que están implicados en varios desajustes metabólicos entre los que se incluyen obesidad, insulino resistencia, dislipidemia e hipertensión (Chmielewska-Kassassir M. y col.; 2013). La activación por fosforilación de estos receptores es debida a ácidos grasos poliinsaturados o derivados (ligandos fisiológicos) y tiazolidinedionas o fibratos (ligandos farmacológicos). Para unirse al elemento de respuesta localizado en la región promotora del gen diana es necesaria la formación de un heterodímero entre PPAR y otro receptor nuclear, el receptor del ácido 9-cis-retinoico (RXR) (Bardot O. y col.; 1993). De los tres subtipos o isoformas que se conocen (α , β/δ , and γ), PPAR γ es el más estudiado. Se expresa en tejido adiposo, lengua, intestino delgado, hígado, riñón, corazón y macrófagos

(Abbott B.D. y col.; 2009), y actúa como núcleo regulador central para la inducción y mantenimiento de la diferenciación y función de las células de grasa. (Tontonoz P. y col.; 1994). PPAR γ se expresa como dos isoformas PPAR γ 1 y PPAR γ 2, generadas por promotores alternativos del mismo gen que dan lugar a distintos ARN mensajeros. Ambos son idénticos salvo por los 30 amino ácidos adicionales presentes en la región amino terminal de PPAR γ 2. Mientras que PPAR γ 1 se expresa en diversos tejidos, la expresión de PPAR γ 2 está casi restringida al adiposo (Mueller E. y col.; 2002). Se usan agonistas de PPAR γ para el tratamiento de dislipidemias e hiperglicemias.

Proteínas de unión al potenciador (C/EBP: CCAAT/Enhancer Binding Protein).

Son una familia de factores de transcripción críticos para la normal diferenciación y función celular de una variedad de tejidos. Consisten en proteínas modulares que tienen 3 dominios: de activación, de dimerización consistente en región rica en aminoácidos básicos y una “cremallera de leucina” (bZIP), y de unión al ADN. Todos los miembros de la familia conservan el dominio de dimerización, requerido para la unión al ADN, gracias al cual, forman homo- y hetero-dímeros con otras familias proteicas. La dimerización con diferentes proteínas modula la actividad transcripcional de genes dianas. El dominio de activación está menos conservado lo cual los hace variar desde potentes activadores a dominantes represores. Los efectos pleiotróficos de estas proteínas son debidos, en parte, a la expresión específica en cada tejido y etapa (Lekstrom-Himes J. y col.; 1998). Los genes pertenecientes a las C/EBP se designan tradicionalmente como C/EBP α , β , γ , δ , ϵ y ζ (Cao Z. y col.; 1991). C/EBP α fue el primero en clonarse. Sus niveles se han medido en

hígado, tejido adiposo, intestino, pulmón, glándula adrenal, células mononucleares de sangre periférica y placenta (Antonson P. y col.; 1995). PPAR γ puede inducir adipogénesis en fibroblastos embrionarios de ratón, mientras que C/EBP α es incapaz de dirigir el programa adipogénico en ausencia de PPAR γ (Rosen E.D. y col.; 2002) lo que sugiere que ambos factores participan en una única ruta de adipogénesis en la que PPAR γ es el factor dominante. Otros dos miembros de esta familia de proteínas, C/EBP β y C/EBP δ , cuya expresión es más temprana que la de C/EBP α , están implicados en la adipogénesis de células 3T3-L1 y son responsables de regular la expresión de C/EBP α (Yeh W.C. y col.; 1995).

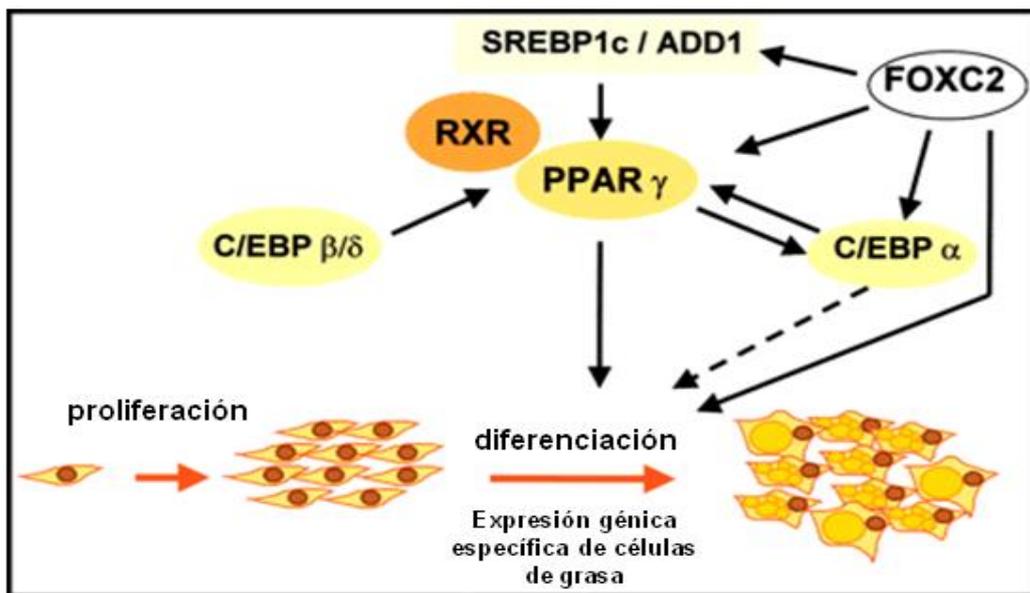


Figura 7. Control transcripcional de la adipogénesis. Tras la proliferación de los preadipocitos, la diferenciación es promovida por varias familias de factores de transcripción. Las proteínas C/EBP β y δ se expresan en primer lugar, seguidas de PPAR γ , que a su vez activa a C/EBP α . C/EBP α ejerce un *feedback* positivo sobre PPAR γ para mantener la diferenciación. Otro factor de transcripción, SREBP1 (Sterol responsive element binding protein 1c, también llamado ADD1 -adipocyte determination and differentiation factor 1-) puede aumentar la actividad transcripcional de PPAR γ . Estos factores inducen la expresión de los genes que caracterizan el fenotipo de los adipocitos diferenciados. El factor de transcripción FOXC2 (Forkhead box C2) también activa a los genes que estimulan la diferenciación de los adipocitos (C/EBP α , PPAR γ , y ADD1/SREBP1). Fuente: Valet P. y col.; 2002.

También son importantes en la adipogénesis y en el tejido adiposo:

Proteínas de unión a ácidos grasos (FABPs: fatty-acid-binding proteins).

Consisten en proteínas citoplasmáticas con distribución específica de tejido implicadas en el almacenamiento y transporte celular de ácidos grasos, así como en la coordinación de las rutas metabólicas e inflamatorias y en la modulación de la expresión génica. (Coe N.R. y col.; 1998). FABP4 (aP2) es una chaperona citoplasmática expresada principalmente en tejido adiposo y macrófagos, y una de las proteínas más abundantes de adipocitos maduros (Maeda K. y col.; 2005). También se ha detectado en altas concentraciones en el suero humano (Xu A. y col.; 2006). Su expresión en progenitores adipocíticos es controvertida pues hay estudios que indican que no se detecta expresión de FABP4 en las células de la fracción del estroma vascular (SVF) del tejido adiposo, una población celular heterogénea que incluye progenitores celulares adiposos (Tang W. y col.; 2008), sin embargo, otros estudios sugieren que FABP4 es expresada por preadipocitos. (Soukas A. y col.; 2001. Tchoukalova Y.D. y col.; 2004). Análisis inmunohistoquímicos de diversos grupos revelaron que FABP4 también se expresa en las células endoteliales capilares de varios órganos, incluyendo corazón, músculo esquelético y tejido adiposo (Elmasri H. y col.; 2009. Masouyé I. y col.; 1997), lo cual sugiere el papel de FABP4 en el transporte de ácidos grasos a través de las células endoteliales capilares en estos tejidos. Aunque el papel biológico de FABP4 aún no está bien comprendido, su función se ha relacionado con la insulino sensibilidad, el metabolismo lipídico y la inflamación (Makowski L. y col.; 2004). FABP4 desencadena la ubiquitinación y consecuente degradación proteasómica de

PPAR γ . Preadipocitos de ratón nulos para FABP4 exhibieron expresión incrementada de PPAR γ y marcada potenciación de la adipogénesis en comparación con las células “wild type”, indicando que FABP4 regula la adipogénesis mediante infraregulación de PPAR γ . (Garin-Shkolnik T. y col.; 2014).

Proteína relacionada con la diferenciación adiposa (ADRP: Adipose differentiation-related protein). ADRP es una proteína de 50 kDa de peso molecular inicialmente clonada por hibridación diferencial a partir de una librería de ADNc de adipocitos 1246 diferenciados. Su ARNm es inducido a pocas horas del comienzo de la diferenciación adiposa en células de ratón, convirtiéndolo en un marcador temprano del programa de diferenciación adiposa (Jiang H.P. y col.; 1992-A. Jiang H.P. y col.; 1992-B). Aparece expresado en altos niveles en tejido adiposo y en otros muchos tipos celulares y tejidos donde los lípidos son acumulados o sintetizados, aunque a menores niveles que en adipocitos (Brasaemle D.L. y col.; 1997). En células 3T3-L1, los niveles proteicos de ADRP se incrementaron en el día 1 de diferenciación y posteriormente decrecieron en el día 4. Los estudios de inmunolocalización a diferentes momentos del programa de diferenciación adiposa en adipocitos 1246 y 3T3-L1 indicaron que ADRP se localizó en los alrededores de la membrana plasmática en las células que comienzan la diferenciación y también fue encontrada en la superficie de las gotas lipídicas de preadipocitos 3T3-L1 cultivados y en adipocitos recién diferenciados (Brasaemle D.L. y col.; 1997). Aunque estos datos sugieran que ADRP puede jugar cierto papel en estadios tempranos de la diferenciación adiposa, poco es conocido sobre su función en

esta etapa y su secuenciación no arroja ninguna información sobre su posible acción en adipocitos. (Gao J. y col.; 1999). La expresión de ADRP se encontró inducida en hígado de ratón tratado con el inhibidor carnitina palmitoiltransferasa I, el cual causó una neutral acumulación lipídica en el órgano (Steiner S. y col.; 1996). La sobreexpresión de ADRP estimula la acumulación de lípidos y la formación de gotas de lípidos sin inducción de otros genes específicos de adipocitos, como PPAR γ , o de otros genes lipogénicos, como FABP4, en células fibroblásticas de ratón. (Imamura M. y col.; 2002). Estos estudios sugieren que ADRP está involucrada en la formación o estabilización de las gotas lipídicas en adipocitos.

ANGIOGÉNESIS

En 1787 el cirujano británico John Hunter usó por primera vez el término “angiogénesis” para describir el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos observado en la cornamenta de renos.

Angiogénesis es el proceso fisiológico que consiste en la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes a través de la migración y proliferación de células endoteliales previamente ya diferenciadas.

Son cuatro los pasos principales que se dan durante la angiogénesis:

1. Estimulación de las células endoteliales por factores angiogénicos:

- a. Factor de Crecimiento Fibroblástico básico (Basic Fibroblast Growth Factor -bFGF-): potente inductor de migración celular endotelial, proliferación y formación tubular; se trata de un factor pleiotrópico no específico para las células endoteliales; su receptor (FGF receptor) pertenece a la familia de las tirosin kinasas.
 - b. Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular (Vascular Endothelial Growth Factor -VEGF-): altamente específico de las células endoteliales; inductor de la expresión de proteinasas extracelulares aumentando la expresión de integrinas específicas para la migración e iniciando la proliferación y migración celular. Se une a receptores endoteliales específicos pertenecientes a la familia de las tirosin kinasas (VEGF-R1/Flt-1, VEGF-R2/Flk-1, VEGF-R3/Flt-4), su expresión es potenciada por condiciones de hipoxia y se inactiva por p53.
2. Degradación de la lámina basal por células endoteliales activadas (vía proteinasas extracelulares). Las células endoteliales activadas alteran sustancialmente sus uniones intercelulares así como a la lámina basal y a los pericitos de forma que se modifica el flujo a través del endotelio activando las proteasas de remodelización de la membrana basal. Estas enzimas degradativas descomponen la matriz extracelular facilitando la migración de las células endoteliales:
- a. Metaloproteinasas de la Matriz Extracelular (Matrix Metalloproteinases -MMPs-): Familia de 22 endopeptidasas

dependientes de Zinc que degradan los componentes de la matriz extracelular. Se clasifican tradicionalmente en función de la especificidad del sustrato (colagenasas, gelatinasas, estromelisininas, matrilisininas). MMP1, MMP2 y MT1-MMP se expresan durante la angiogénesis.

- b. Urokinasa (uPA): Convierte el plasminógeno (zimógeno) en plasmina, serín proteasa que desencadena una cascada proteolítica que; dependiendo de la ubicación en que se encuentre, participa en trombolisis o en degradación de la matriz extracelular. La unión a su receptor de superficie celular (uPAR) puede inducir la proliferación celular y regular la migración celular.

3. Formación del brote capilar y migración de células endoteliales:

- a. La migración de células endoteliales forma la punta del brote capilar y, junto con la proliferación celular, contribuye al aumento de longitud del vaso que se está desarrollando.
- b. Expresión de integrinas tales como CD29/ITG β 1, CD31/PCAM-1, CD49a/VLA1, CD73 y CD90/Thy-1 en los vasos recientemente formados. Las integrinas o proteínas de adhesión actúan como “garfios” para ayudar a que el brote capilar crezca ya que permiten la migración de las células endoteliales por interacción con componentes específicos de la matrix circundante. Las interacciones entre estas integrinas específicas y los receptores del factor de crecimiento tales como VEGF-Rs median los efectos pro-angiogénicos (Serini G. y col.; 2008).

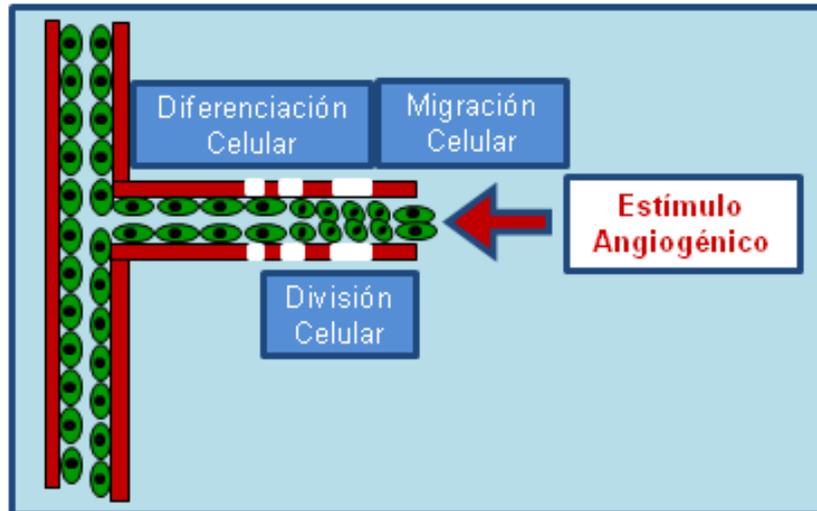


Figura 8. Migración y Proliferación Celular.

Fuente: Berkowitz Lab Home Page

4. Maduración del nuevo vaso:

- a. Angiopoyetina (Ang1). Producida por las células estromales circundantes, induce la supervivencia celular endotelial y la estabilización de los nuevos tubos capilares (se une al receptor Tie2 de las células endoteliales el cual inhibe la apoptosis).
- b. Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas (Platelet Derived Growth Factor -PDGF-). Producido por las células endoteliales del nuevo tubo capilar, recluta pericitos que interactúan en la estabilización de nuevo vaso.
- c. La nueva membrana es sintetizada por los capilares sanguíneos recién formados. La interacción entre las células endoteliales, la matriz extracelular y las células mesenquimales es condición primordial para la formación de una vasculatura estable.

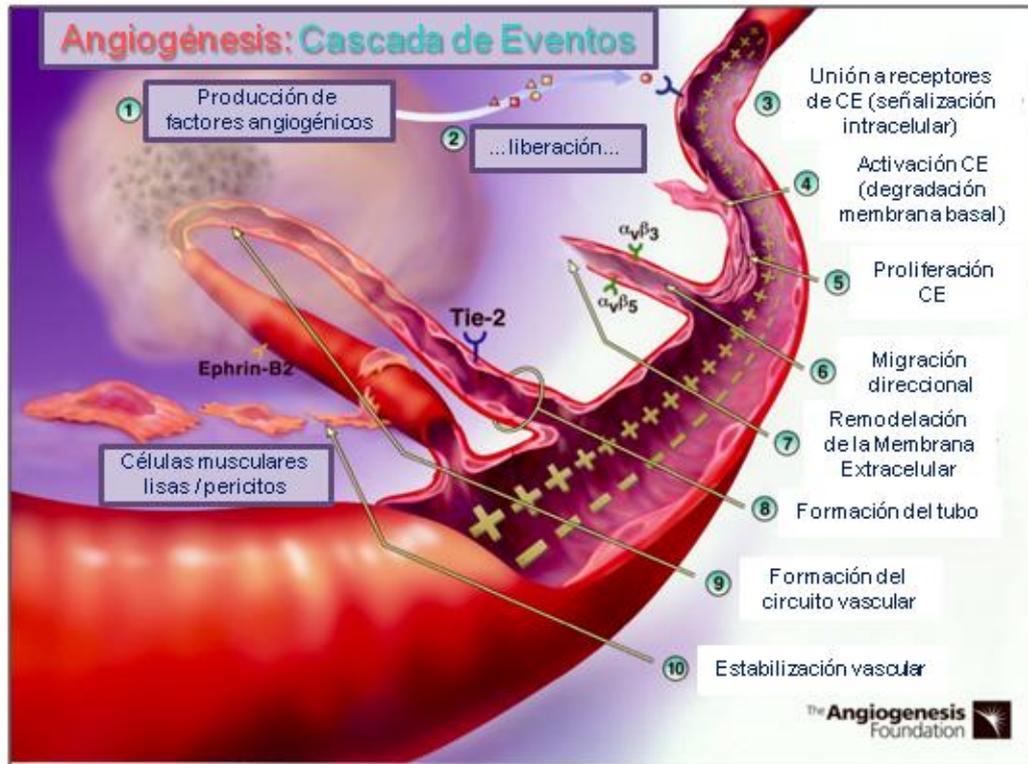


Figura 9. Cascada de eventos de la angiogénesis: ¿cómo crecen los nuevos vasos sanguíneos? El proceso de angiogénesis se produce como una ordenada serie de eventos en cascada. Los tejidos lesionados, enfermos o con necesidad de circulación, producen y liberan factores de crecimiento angiogénicos (proteínas) que se difunden a los tejidos cercanos. Estos factores de crecimiento angiogénicos se unen a receptores específicos que se localizan en las células endoteliales (CE) de los vasos sanguíneos cercanos preexistentes. Una vez que los factores de crecimiento se unen a sus receptores, las células endoteliales se activan y se envían señales desde la superficie de la célula al núcleo. La maquinaria de la célula endotelial comienza a producir nuevas moléculas, incluyendo enzimas. Estas enzimas se disuelven en pequeñas vesículas recubiertas que se forman en la membrana basal que rodea a todos los vasos sanguíneos existentes. Las células endoteliales comienzan a dividirse (proliferar) y hacia el tejido enfermo o lesionado. Unas moléculas de adhesión especializadas llamadas integrinas sirven como garfios para ayudar a brotar a los nuevos vasos sanguíneos hacia adelante. Se producen enzimas adicionales (metaloproteinasas de la matriz) para disolver el tejido en la zona de la incipiente brotación. A medida que el vaso se va extendiendo, el tejido se remodela a su alrededor. Células endoteliales se van situando alrededor para formar el tubo del nuevo vaso sanguíneo. Los tubos de los vasos sanguíneos individuales se van conectando para formar todo el circuito de nuevos vasos sanguíneos por el que circular sangre. Finalmente, los tubos de los vasos sanguíneos recién formados se estabilizan gracias a las células musculares especializadas (células de músculo liso, pericitos) que proporcionan el necesario soporte estructural. El flujo de sangre comienza. Fuente: The Angiogenesis Foundation.

Cuando la generación de nuevos vasos sanguíneos es suficiente, se produce disminución de los factores angiogénicos y aumento de la concentración local de los factores inhibidores de la angiogénesis.

La angiogénesis es imprescindible en condiciones fisiológicas para el crecimiento del organismo, desarrollo embrionario y restablecimiento del flujo sanguíneo en los tejidos tras una lesión (cicatrización de heridas, por ejemplo). En mujeres, se desarrolla cíclicamente en ovario y útero para madurar el óvulo durante la ovulación y reconstruir la pared uterina en el ciclo reproductivo menstrual; en el embarazo se da para reconstrucción de la placenta y establecer la circulación sanguínea madre-feto. Sin embargo, una excesiva angiogénesis puede conducir a trastornos patológicos tales como aterosclerosis, diabetes, psoriasis, adiposidad y cáncer (los tumores encuentran en dicho fenómeno la forma de abastecerse de nutrientes y oxígeno que les permiten subsistir y desarrollarse). Numerosas terapias oncológicas se basan en el empleo de agentes antiangiogénicos, siendo la principal diana el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor) o su receptor (VEGF-R2) (Witte L. y col.; 1998).

El factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) es el principal mediador de la angiogénesis, tanto fisiológica como patológica: regulador clave de la angiogénesis fisiológica durante la embriogénesis, el crecimiento del esqueleto y las funciones reproductivas, VEGF también se encuentra implicado en la angiogénesis asociada a tumores, trastornos neovasculares y de permeabilidad vascular (Dvorak H.F. y col.; 1999) y otras condiciones

patológicas como la degeneración macular relacionada con la edad. Fue el primer miembro de los factores angiogénicos que se clonó y, actualmente, aún permanece como el factor de crecimiento angiogénico mejor caracterizado (Ferrara N. y col.; 2003). VEGF es reconocido por ser un potente estimulador de la proliferación y migración de las células endoteliales y regulador de su supervivencia. Otros factores peptídicos de crecimiento, tales como el factor de crecimiento fibroblástico (FGF) o la angiopoyetina (Ang) también influyen en la proliferación endotelial y en su función, sin embargo, la mayoría de estos factores actúan complementando la señalización y coordinación del VEGF. (Wang S. y col., 2008). Estudios génicos dirigidos donde la pérdida de un único alelo de VEGF resulta letal en embriones de ratón entre los días 11 y 12 debido a un deterioro de la angiogénesis que resulta en diversas anomalías de desarrollo, han mostrado la crítica importancia de VEGF en vasculogénesis y angiogénesis (Ferrara N. y col.; 1996). Su expresión génica está influenciada por una variedad de factores, entre los que se incluye hipoxia, insulina, factores de crecimiento y diversas citokinas (Liekens, S. y col.; 2001).

VEGF-A (17-23 kDa) es el principal factor angiogénico; estimula la proliferación y migración de las células endoteliales (Carmeliet P. y col.; 1996). VEGF-B (21 kDa) es idéntico al VEGF-A en un 43% y también promueve la angiogénesis ya que está implicado en la degradación de la matriz extracelular vía regulación de la activación del plaminógeno (Olofsson B. y col.; 1998). VEGF-C presenta un 30% de homología con VEGF-A y juega un importante papel tanto en angiogénesis como en linfangiogénesis (Joukov V. y col.; 1996. Karkkainen M.J. y col.; 2004). VEGF-D es idéntico al VEGF-C en un 48% y

también promueve el crecimiento de los vasos linfáticos (Stacker S.A. y col.; 2001).

Estos ligandos se unen a receptores pertenecientes a la familia de las tirosín quinasa conocidos como VEGF-R1/Flt-1, VEGF-R2/Flk-1 y VEGF-R3/Flt-4. VEGF-R1 es un regulador positivo de la migración de monocitos y macrófagos y se ha descrito como regulador, tanto positivo como negativo, de la capacidad de señalización de VEGF-R2. VEGF-R2 está implicado en todos los aspectos fisiológicos y patológicos de la biología celular del endotelio vascular, mientras que VEGF-R3 es importante para el desarrollo y función de las células endotelio-linfáticas. (Olsson A.K. y col.; 2006).

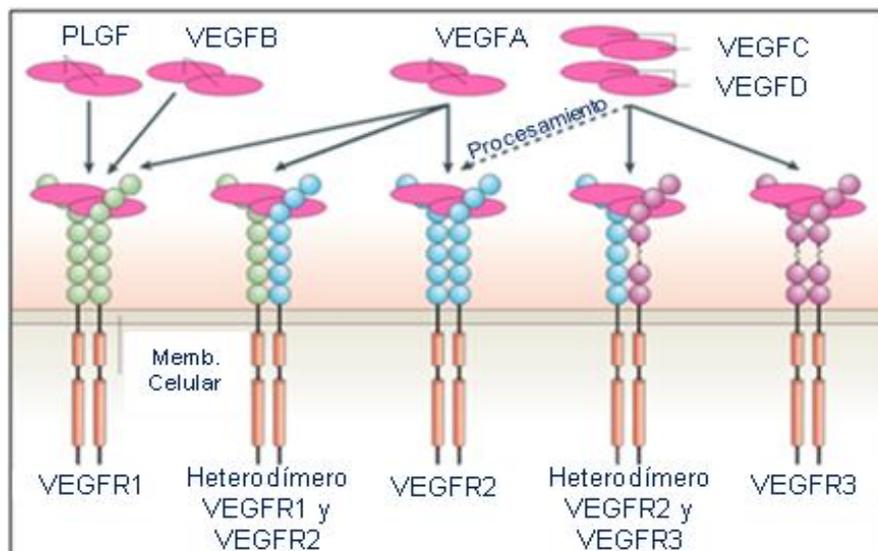


Figura 10. Receptores de los factores de crecimiento del endotelio vascular. Los factores de crecimiento del endotelio vascular de mamíferos (VEGFs) se unen a receptores tipo tirosín quinasa (VEGF-Rs) que se ensamblan como dímeros permitiendo la formación de receptores homo y hetero-diméricos. El factor de crecimiento placentario (placenta growth factor -PLGF-) es una proteína que pertenece a la familia de los VEGFs y que se une a VEGF-R1, al igual que VEGF-A y B. VEGF-A también se une a VEGF-R2 y VEGF-C y D se unen a VEGF-R3. El procesamiento proteolítico de VEGF-C y D permite la unión de éstos a VEGF-R2, sin embargo, esta unión es de menor afinidad que la unión con VEGF-R3. Memb. Celular: membrana celular. Fuente: Olsson A.K. y col.; 2006.

En el proceso de angiogénesis también juegan un papel fundamental las integrinas. El creciente interés en ellas reside en que se encuentran involucradas en los procesos de adhesión y reconocimiento celular (célula/matriz extracelular, célula/célula -leucocito/leucocito y leucocito/célula endotelial- y célula/sustrato -mediadoras en la adhesión de las plaquetas con el fibrinógeno y otros ligandos-), de una gran variedad de procesos entre los que se incluyen angiogénesis, embriogénesis (en asociación con otras CAM's, constituyen uno de los factores esenciales en la migración celular y morfogénesis), hemostasis, reparación tisular (en fenómenos como la inflamación, la cicatrización y la trombosis las integrinas permiten la interacción entre el tejido dañado y las células circulantes), respuesta inmune y difusión metastásica de células tumorales. Las integrinas constituyen una familia de moléculas de adhesión (Cell Adhesion Molecules -CAM's-) que relacionan el compartimento extracelular con el intracelular ya que analizan el microambiente e inducen la pertinente señalización molecular en estados normales y patológicos.

Estos receptores de membrana son glicoproteínas formadas por un heterodímero con 2 subunidades polipeptídicas (α y β) unidas de forma no covalente. Hay, al menos, 18 subunidades α y 8 β descritas en mamíferos. La asociación de distintas subunidades permite la formación de las integrinas lo que provee a la célula de una amplia versatilidad en sus propiedades de adhesión.

- CD90/Thy-1: la activación de Thy-1 puede promover la activación de las células T, papel típicamente conocido de esta integrina, sin embargo Thy-1 también afecta numerosos procesos no inmunológicos entre los que se incluyen la adhesión celular, crecimiento de neuritas, crecimiento tumoral, migración y muerte celular. Thy-1 es un regulador relevante en las interacciones célula-célula y célula-matriz, con importantes papeles en la regeneración nerviosa, metástasis, inflamación y fibrosis. (Rege T.A. y col.; 2006).
- CD31/PCAM-1: Molécula presente en todas las células dentro del compartimento vascular; se encuentra expresada en diferentes grados en la mayoría de los subtipos de leucocitos, en plaquetas y en células endoteliales donde su expresión está ampliamente concentrada en las uniones entre células adyacentes. PECAM-1 es una eficiente molécula señalizadora y actualmente se le conoce tener diversos papeles en biología vascular incluyendo angiogénesis, función plaquetaria, trombosis, mecanosensibilidad de células endoteliales en respuesta a estrés por fluidos viscosos y regulación de múltiples estados de migración leucocitaria a través de las paredes venosas. (Woodfin A. y col.; 2007).
- CD29/ITG β 1: coordina actividades funcionales generales tales como inflamación, proliferación, migración, adhesión e invasión. Recientemente se ha implicado en la resistencia terapéutica de varios modelos de cáncer puesto que tiene importantes funciones durante la

vascularización tumoral dependiente de VEGF y la angiogénesis independiente de VEGF (Leenders W.P. y col.; 2004. Azam F. y col.; 2010).

- CD49a/VLA1: La integrina CD49a/VLA1, expresada en células endoteliales, se conoce por ser pro-angiogénica ya que el bloqueo con anticuerpos o delecciones de la subunidad α de esta integrina resultan en un descenso de la angiogénesis a través del factor endotelial de crecimiento vascular. Ratones nulos para la subunidad $\alpha 1$ de esta integrina poseen menor y más pequeña vascularización de tumores que sus semejantes salvajes (Abair T.D. y col.; 2008).

La angiogénesis se ve modificada con el incremento de edad. El envejecimiento va acompañado de alteración de la angiogénesis debido a múltiples disfunciones y de una deficiente expresión de ciertos factores de crecimiento angiogénicos. La formación de capilares se vio disminuida por primera vez en ratas de mediana edad con respecto a jóvenes (Arthur W.T. y col.; 1998). Esta disminución de la respuesta angiogénica está asociada con una reducida proliferación de células endoteliales y una menor producción de VEGF endógeno. (Wang H. y col.; 2004). La invasión angiogénica se presenta retardada en ratones de 23-25 meses de edad respecto a otros de 6-8 meses, y se aprecia un descenso significativo en la densidad capilar, menor respuesta inflamatoria, menor deposición de colágeno y falta de expresión de TGF- $\beta 1$ y VEGF en los tejidos de ratones adultos respecto a los jóvenes, aún siendo similar la morfología de los microvasos y la composición de la membrana basal

en ambos grupos de estudio (Sadoun E. y col.; 2003). Este fenómeno ha sido posteriormente confirmado en otros modelos animales y en humanos donde se ha mostrado que el deterioro funcional de las células progenitoras endoteliales de sujetos de edad avanzada correlaciona con la disfunción endotelial (Heiss C. y col.; 2005). El declive de la función endotelial que acompaña al multifactorial proceso de envejecimiento, incluye alteraciones relacionadas con estrés oxidativo, citoquinas pro-inflamatorias, factores genéticos y senescencia de células endoteliales (Herrera M.D. y col.; 2010).

RELACIÓN ADIPOGÉNESIS / ANGIOGÉNESIS

En estadios tempranos del desarrollo del tejido adiposo, la adipogénesis se encuentra estrechamente asociada a la angiogénesis puesto que la vasculatura responde incrementando el número y/o tamaño de los vasos sanguíneos para proporcionar nutrientes y oxígeno al tejido adiposo en crecimiento (Lijnen H.R. y col.; 2008). La densidad de los vasos sanguíneos en el tejido adiposo puede no ser reflejo de la verdadera actividad angiogénica que hay en el mismo ya que el número de células que pueden ser soportadas por un mismo vaso sanguíneo es variable y, del mismo modo, el número y/o tamaño de los adipocitos puede afectar a la densidad de los vasos sanguíneos (Lijnen H.R. y col.; 2008). Es bien conocido que el sistema del factor de crecimiento del endotelio vascular representa la mayor parte de la actividad angiogénica en el tejido adiposo (Hausman G.J. y col.; 2004). Diversos

estudios han examinado la regulación de la expresión de VEGF en el tejido adiposo marrón de ratas donde la expresión de éste es mucho mayor que en el tejido adiposo blanco. La exposición a bajas temperaturas induce rápida y transitoriamente la expresión génica de VEGF en el tejido adiposo marrón, la cual llega a su máximo tras una hora de exposición a frío (Asano A. y col.; 1997). Como resultado, VEGF ha sido usado en numerosas pruebas de terapias génicas o proteicas preclínicas y clínicas tempranas con distintos grados de éxito (Sosman J.A. y col.; 2003).

Se ha comprobado que el tejido adiposo blanco produce y secreta muchos tipos diferentes de factores proangiogénicos tales como VEGF-A y VEGF-B, los dos factores angiogénicos clave producidos por adipocitos (Saiki A. y col.; 2006). Otros factores derivados del tejido adiposo con propiedades pro-angiogénicas son VEGF-C y VEGF-D, los cuales se han encontrado ser importantes en la propia formación y mantenimiento de la red linfática (Asano A. y col.; 1997).

El tejido adiposo contiene una gran diversidad de tipos celulares entre los que se incluyen adipocitos, células estromáticas, células endoteliales y células inflamatorias (Rehman J. y col.; 2004). Esta heterogénea diversidad en la población celular determina la expresión de múltiples factores de crecimiento y citoquinas que de forma individual, o en conjunto, regulan el crecimiento de los vasos, aunque poco se conoce sobre la relación funcional entre dichos factores (Cao Y. y col.; 2005). Entre los factores angiogénicos producidos por los adipocitos en crecimiento se incluye leptina (el hallazgo de que las células

endoteliales expresaban la forma funcional del receptor para la leptina permitió descubrir su actividad angiogénica promoviendo la formación del tubo celular *in vitro* y la neovascularización corneal *in vivo* (Sierra-Honigmann M.R. y col.; 1998), VEGFs, Factor de crecimiento de fibroblastos (FGF-2: Fibroblast growth factor-2), Factor de crecimiento de hepatocitos (HGF: Hepatocyte growth factor), Factor de crecimiento insulínico (IGF: Insulin growth factor), Factor de necrosis tumoral- α (TNF- α : tumor necrosis factor alpha), Factor de crecimiento transformante- β (TGF- β : transforming growth factor beta), Factor de crecimiento placentario (PLGF: placental growth factor, resistina, Factor tisular (TF: tissue factor), Neuropéptido Y NPY), y angiopoyetinas (Cao Y. y col.; 2007) Los preadipocitos y los adipocitos también producen pequeñas moléculas lipídicas no proteicas tales como monobutirina que estimulan la angiogénesis en el tejido adiposo (Dobson D.E. y col.; 1990. Wilkison W.O. y col.; 1991). Por su parte, las células del estroma secretan altos niveles de una variedad de factores angiogénicos entre los que se incluyen VEGFs, HGF, FGF-2, y TGF- β (Bouloumie A. y col.; 2001). Y el reclutamiento que se produce en el tejido adiposo de células inflamatorias también contribuye significativamente a la neovascularización adiposa, por ejemplo, los macrófagos activados producen potentes factores angiogénicos tales como TNF- α , VEGFs, FGF-2 e interleuquinas como la 1b (IL-1b), la 6 (IL-6), y la 8 (IL-8) (Wellen K.E. y col.; 2003. Wellen K.E. y col.; 2005).

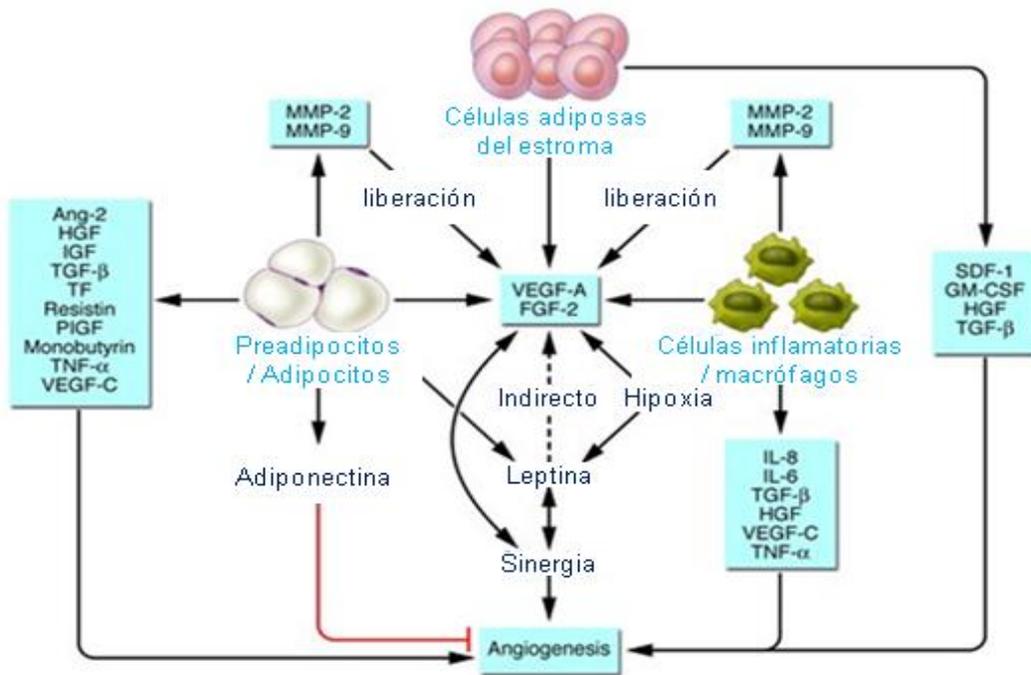


Figura 11. Regulación de la angiogénesis en el tejido adiposo por múltiples factores. La diversidad celular en el tejido adiposo contribuye a la producción de múltiples factores angiogénicos e inhibidores que regulan la angiogénesis de este tejido. La relación entre los diferentes factores puede resultar en una sinergia angiogénica. Por ejemplo, leptina y VEGF-A o FGF-2 podrían estimular la angiogénesis de manera sinérgica. La hipoxia celular puede ir más allá regulando los niveles de expresión de VEGF y leptina. MMPs pueden incrementar la viabilidad de los factores angiogénicos por liberación de los VEGF confinados a la matriz extracelular. Fuente: Cao Y.; 2007.

El tejido adiposo ha mostrado ampliamente, en muchas áreas del organismo, sus cualidades angiogénicas y anti-inflamatorias (Zuk P.A. y col.; 2002. Salas J. y col.; 1990), y numerosos datos demuestran que el tejido adiposo induce la angiogénesis (Valina C. y col.; 2007). Como ya se ha mencionado, en adultos la actividad inmunológica del timo cesa puesto que sufre una involución natural, pasando a ser principalmente tejido adiposo (Gruver A.L. y col. y col.; 2007). Esta “conversión” hacia tejido graso constituye una característica que nos lleva a pensar que podría utilizarse el tejido tímico como potencial fuente angiogénica, al igual que se utilizan otros tejidos adiposos (Zuk P.A. y col.; 2002. Salas J. y col.; 1990).

CARDIOPATÍA ISQUÉMICA

En la última década se ha acumulado gran cantidad de información sobre la magnitud del problema de la cardiopatía isquémica y sus factores de riesgo en España. Esta enfermedad continúa siendo la primera causa individual de muerte en varones y la tercera en mujeres, siendo la causa del 11 y del 10% del total de las muertes producidas, respectivamente. Sus principales consecuencias son el infarto agudo de miocardio y la angina de pecho, pero también puede manifestarse como una muerte súbita.

La cardiopatía isquémica es una enfermedad que impide que el corazón reciba la sangre que necesita. Está ocasionada por arteriosclerosis de las arterias coronarias, que son las encargadas de proporcionar sangre al miocardio. La arteriosclerosis consiste en la estenosis o estrechamiento de las arterias a consecuencia de la acumulación de lípidos, células inflamatorias y formación de colágeno en las paredes arteriales. Carece de síntomas hasta que la estenosis es tan severa que se produce un desequilibrio entre el aporte de oxígeno al miocardio y sus necesidades y se produce una isquemia miocárdica o una trombosis de la arteria, lo que provoca la falta de oxigenación del corazón dando lugar al síndrome coronario agudo.

La cirugía de revascularización coronaria agrupa las técnicas quirúrgicas destinadas a restablecer el flujo coronario a través de injertos que hacen la labor de “puentes” que llevan la sangre más allá de la obstrucción coronaria. Estos injertos o “puentes” pueden ser de origen arterial o venoso, teniendo los

arteriales mayor durabilidad. El implante de los injertos se suele realizar con el corazón parado, para lo que se inyecta una solución denominada cardioplejia y se debe derivar la circulación a una máquina que mantenga la perfusión de todos los órganos ejerciendo de bomba mientras dura la cirugía (circulación extracorpórea -CEC-).

Normalmente, las intervenciones en el corazón (operaciones de bypass, reemplazo de válvula cardíaca o trasplantes de corazón) se realizan a corazón abierto. Durante estas operaciones, el esternón se divide a lo largo para abrir el tórax y tener un adecuado acceso al corazón. Esternotomía hace referencia a la división del esternón. En el caso de la total se divide el esternón a lo largo en su totalidad (óptimo acceso a todo el corazón) y en la esternotomía parcial, únicamente se divide la parte superior o inferior (acceso a la parte relevante del corazón). Con el bisturí, el cirujano realiza una incisión a lo largo del esternón y divide el tejido existente bajo la piel. A continuación, el esternón se secciona con una sierra quirúrgica para esternotomía. Para obtener un acceso óptimo al corazón, el esternón se abre con un separador y debido a su localización anterior a la arteria aorta y por debajo de las venas innominadas, se elimina la glándula tímica total o parcialmente para comenzar la intervención. Por tanto, parte del timo, o la glándula en su totalidad, es desechado durante los procedimientos de canulación aórtica en la cirugía cardiovascular de canulación de la aorta ascendente en pacientes con necesidad de un bypass cardiopulmonar por isquemia cardíaca, lo cual convierte a este tejido en una fuente de tejido adiposo fácilmente disponible para su utilización y estudio.

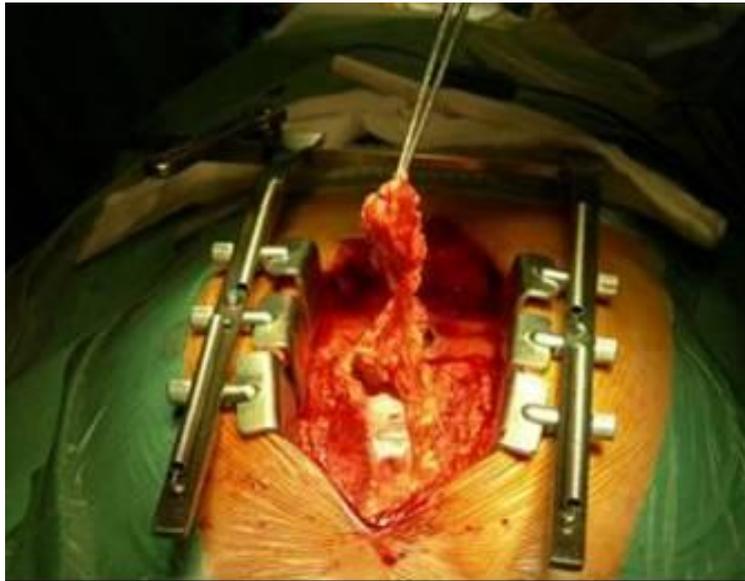


Figura 12. Esternotomía en cirugía cardíaca. El tejido adiposo de timo se localiza alrededor de la vena innominada, sobre el pericardio y justo alrededor del lugar de canulación de la aorta durante el bypass cardiopulmonar. Fuente: Dr. Julián Salas, Dpto. Cirugía Cardiovascular, Hospital Carlos Haya, Málaga.

A pesar de los recientes avances en prevención y control de los factores de riesgo y de la variedad de tratamientos invasivos y no invasivos que hay disponibles, existen muchos pacientes que permanecen asintomáticos y que poseen territorios isquémicos potencialmente recuperables y que no pueden beneficiarse con estas terapias existentes. La cirugía coronaria es hoy día la técnica más paliativa que se encuentra y, uno de los objetivos del tratamiento es conseguir la revascularización más completa posible y con el menor riesgo para el paciente coronario. Sin embargo, hasta el 12% de los pacientes remitidos para el tratamiento de revascularización coronaria no son adecuados para la cirugía o angioplastia (Mukherjee D. y col.; 1999); otras veces, dicha revascularización se da de forma incompleta por existir áreas de miocardio infartadas, territorios irrigados por vasos no puenteables debido a su pequeño

calibre, zonas de peor o nula accesibilidad... Por ello, la cirugía es una técnica que es recomendable que vaya acompañada por otras prácticas como:

- Implantación o aplicación intramiocárdica de factores de crecimiento. Estudios preclínicos de transferencia génica han demostrado que la expresión de VEGF es capaz de estimular el desarrollo de vasos colaterales en modelos animales de isquemia en miembros inferiores (Tsurumi Y. y col.; 1997) y de isquemia del miocardio (Tio R.A. y col.; 1999. Lee L.Y.; 2000). Por otro lado, ensayos clínicos han documentado la eficacia de la transferencia génica del VEGF en pacientes con enfermedad vascular periférica (Rajagopalan S. y col.; 2001. Kim H.J. y col.; 2004) y cardiopatía isquémica (Rosengart T.K. y col.; 1999. Sarkar N. y col.; 2001).
- Terapia génica inductora de angiogénesis (Fukuda S. y col.; 2004). Con esta estrategia de angiogénesis se pretende promover la formación de vasos sanguíneos para prevenir o controlar enfermedades isquémicas (Fam N.P. y col.; 2003).
- Inyección de células madres, capaces de regenerar zonas dañadas, como serían:
 - o Células madre de médula ósea. En ratones y cerdos se ha demostrado que las células procedentes de la médula ósea son capaces de lograr la regeneración del miocardio infartado e inducir miogénesis y angiogénesis (Wollert K.C. y col.; 2005).

- Mioblastos. En ciertos experimentos se ha obtenido con éxito la regeneración miocárdica y la angiogénesis mediante el trasplante de cardiomiocitos fetales o mioblastos procedentes de músculos estriados (Menasché P. y col.; 2003. Siminiak T. y col.; 2003). La mayoría de los estudios han mostrado que el trasplante de mioblastos contribuye a mejorar la función cardíaca (Valdés Chavarri M. y col.; 2005).
- Algún otro tipo de células pluripotenciales, como por ejemplo las derivadas de tejido adiposo (Minteer D. y col.; 2013).

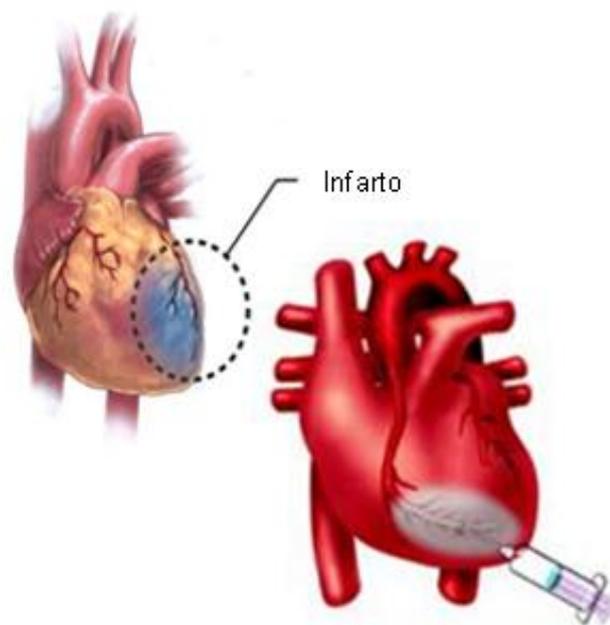


Figura 13. Dibujo representativo de inyección de células madre en zonas de miocardio infartado. Inyección de células madre capaces de regenerar zonas dañadas de miocardio mediante revascularización. Fuente: A.D.A.M. Images.

CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES

Las células madre mesenquimales (MSCs: Mesenchymal stem cells) son una población heterogénea de células progenitoras pluripotentes y adultas con morfología fibroblastoide y capacidad para diferenciarse en células de diversos linajes, entre las que se incluyen osteocitos, adipocitos, condrocitos, miocitos, cardiomiocitos, fibroblastos, miofibroblastos, células epiteliales y neuronas (Liu Z.J. y col.; 2009). Las MSCs residen principalmente en la médula ósea, pero también pueden existir en otras localizaciones tales como tejido adiposo, sangre periférica, cordón umbilical, hígado y tejidos fetales. Aisladas de sus diferentes localizaciones se han logrado establecer cultivos que han permitido estudiar sus propiedades funcionales y fenotípicas. (Socarrás-Ferrer B.B. y col.; 2013).

Por definición, las células madre tienen que ser auto-renovables, clonables y multipotentes tanto *in vitro* como *in vivo*. Las células madre son capaces de dividirse asimétricamente en dos células hijas, una semejante a la madre y otra que dará lugar a la múltiple progenie. El resultado de esta replicación asimétrica es que tras cada división de las células madre, parte de la progenie entra en fase de diferenciación mientras otras permanecen como células madre indiferenciadas, manteniendo su capacidad de auto-renovación. (Moore K.L. y col.; 2007) Cuando son estimuladas con señales específicas estas células pueden ser liberadas de su nicho en la médula ósea hacia la circulación y reclutarse en el tejido diana, donde son sometidas “in situ” a diferenciación contribuyendo a la regeneración tisular y la homeostasis.

Diversas características de estas células, tales como el potencial para diferenciarse hacia múltiples linajes y su capacidad de expandirse “*ex vivo*” mientras mantienen su linaje original sin compromiso de diferenciación, convierten a estas células en dianas muy interesantes para su potencial uso en medicina regenerativa e ingeniería tisular. (Habib H.S. y col.; 2011). Este hecho está adquiriendo gran importancia en los últimos tiempos estando en auge el aislamiento de células madre mesenquimales progenitoras a partir de tejidos para el tratamiento de diversos tipos de enfermedades. Uno de los aspectos más interesantes de la terapia con células madres es la clonación terapéutica, estrategia que utiliza cultivos de células madre para producir grandes cantidades de células madre que posteriormente se trasplantan en el órgano diana. (Hochedlinger K. y col.; 2003).

La reparación de los tejidos dañados es crítica para la supervivencia. Reparación hace referencia a la restauración de la arquitectura y función tisular tras la lesión y consiste en la proliferación de los distintos tipos celulares y una estrecha interacción entre células, matriz extracelular y función celular. Sin embargo en el cuerpo humano existen tejidos con una mayor parte de células diferenciadas de forma terminal en la vida postnatal y una mínima cantidad de células con capacidad de replicación, por lo que se encuentra limitada su capacidad de regeneración tras una lesión. Entre ellos se incluyen neuronas y células del músculo cardíaco (Sharma R.K. y col.; 2012). El notable potencial de las células madre para desarrollarse en diferentes células dentro del cuerpo humano durante la vida, puede servir como sistema de reparación interna para reponer las células muertas o a punto de morir.

La primera causa de mortalidad en los países desarrollados siguen siendo las enfermedades cardiovasculares, seguida por el cáncer. La tasa de mortalidad en España por enfermedades cardiovasculares se sitúa en un 31,1 %, según los últimos datos disponibles del Instituto Nacional de Estadística (INE) y de la Fundación Española del Corazón. Es decir que, aproximadamente, una de cada 3 muertes que se producen es debida a alguna enfermedad cardiovascular. Este hecho, enfatiza la necesidad de novedosas intervenciones cardiovasculares que causen impacto sobre dicha morbilidad y mortalidad cardiovascular. La utilización de terapias con células madre, a través de la aplicación de múltiples estrategias y nuevos métodos, puede ofrecer una rápida regeneración efectiva del miocardio proporcionando la supervivencia a largo plazo de pacientes con daño miocárdico permanente, ya sea mediante la estimulación de la generación local, o proporcionando un suministro continuo de células madre al miocardio. Las células madre mesenquimales han demostrado su capacidad de reparación miocárdica en modelos de daños cardíacos. El mecanismo de estas terapias parece estar fundamentalmente mediado por función paracrina, más que por injerto en el miocardio hospedador, por lo que su potencial uso es en terapias alogénicas. (Psaltis P.J. y col.; 2008. Hare J.M. y col.; 2009).

El estudio de las células madre y su papel en el tratamiento de las enfermedades cardiovasculares está evolucionando a un ritmo muy rápido. Las primeras experiencias en el uso de terapias intracoronarias de células madre para tratar daños en corazones isquémicos resultaron en una mejora de la motilidad segmentaria a los tres meses de la aplicación de células

mononucleares de médula ósea tras la realización de una angioplastia coronaria transluminal percutánea (Strauer B.E. y col.; 2002). Estos resultados fueron confirmados por otro estudio en pacientes que recibieron terapia intracoronaria de células madre (células mononucleares de médula ósea y células progenitoras sanguíneas) en los vasos afectados tras su intervención por infarto de miocardio agudo (Assmus B. y col.; 2002). Posteriormente, se aprobó en Estados Unidos el primer ensayo para evaluar el uso de células madre de médula ósea en la mejora de la angiogénesis en pacientes con insuficiencia cardíaca de miocardio hibernado. Este ensayo también demostró la eficacia y éxito de la inyección endocárdica directa de las células de médula ósea autólogas (Perin E.C. y col.; 2003). La viabilidad y eficacia de la inyección intracoronaria de células madre de sangre periférica también fue evaluada en el ensayo “MAGIC” donde se mostró la mejora de la función cardíaca y se demostró la promoción de la angiogénesis en pacientes con infarto de miocardio (Kang H.J. y col.; 2004).

Células miocárdicas de biopsias exhibieron características típicas de células progenitoras endoteliales circulantes tales como CD34, CD31, KDR y c-kit positivo, marcadores que sugieren su origen de médula ósea (Messina E. y col.; 2004). La capacidad de estas células progenitoras endoteliales para acumularse en el corazón y generar miocardio funcional es congruente con su papel en la reparación cardíaca. Además, las células progenitoras endoteliales derivadas de médula ósea, han mostrado en ratones revertir el declive de la actividad angiogénica cardíaca asociado con la edad (Edelberg J.M. y col.; 2002). Otros estudios mostraron que la inyección local de células madre

cardíacas humanas en el miocardio de ratones inmunodeprimidos permite la regeneración miocárdica con la generación de un corazón quimérico que contenía miocardio humano con miocitos, arteriolas coronarias y capilares, poniéndose de manifiesto el uso de células madre cardíacas humanas como posible terapia ante cardiomiopatías (Bearzi C. y col.; 2007).

TEJIDO ADIPOSO Y CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES

Los estudios iniciales relacionados con la medicina regenerativa y la terapia celular fueron realizados con mioblastos esqueléticos (Menasché P. y col.; 2003. Siminiak T. y col.; 2003), con células derivadas de la médula ósea (Wollert K.C. y col.; 2005), y con otros subtipos celulares como las células progenitoras endoteliales derivadas de la sangre (EPC: endothelial progenitor cells) (Körbling M. y col.; 2003). En los últimos tiempos está llamando la atención la posibilidad del uso de terapias que utilizan las células que residen en la fracción del estroma vascular del tejido adiposo, las cuales tienen potencial de diferenciación *in vitro* (Rada T. y col.; 2012. Rada T. y col.; 2009).

Son numerosos los investigadores que han mostrado el tejido adiposo como una abundante y accesible fuente de células madre multipotentes para medicina regenerativa (Zuk P.A. y col.; 2002). Desde las primeras reseñas que se encuentran a finales de los 60 (Hollenberg C.H. y col.; 1969), múltiples laboratorios han establecido de manera independiente que las células

estromales, similares a aquéllas identificadas en la médula ósea, pueden ser aisladas de forma reproducible del tejido adiposo (Gimble J. y col.; 2003).

En rasgos generales, el tejido adiposo es sometido a una serie de pasos de homogenización, digestión enzimática, centrifugación diferencial, lisis de eritrocitos y lavados que dan lugar a dos fracciones, la fracción del estroma vascular (SVF: Stromal vascular fraction), y los adipocitos diferenciados o maduros. La fracción del estroma vascular consiste en una población celular heterogénea que contiene células madre mesenquimales, células precursoras endoteliales, preadipocitos, macrófagos anti-inflamatorios, células T reguladoras fibroblastos, linfocitos y pericitos, entre otras (Han J. y col.; 2010). La eficiencia del proceso de aislamiento de células de SVF depende de la naturaleza del depósito de tejido adiposo utilizado, así como de la condición del donador (edad, obesidad...). Por ejemplo, Células de la SVF de depósitos viscerales son más propensas a la apoptosis y, por tanto, menos proliferativas que las mismas células aisladas de depósitos subcutáneos (Cawthorn W.P. y col.; 2012). Se ha mostrado que las células de la fracción SVF pueden crecer bajo condiciones especiales, cuando hay un proceso de purificación de células dentro del medio de cultivo, con enriquecimiento en ciertas células parecidas a las células madre mesenquimales. De este modo, el tejido adiposo constituye una de las más ricas fuentes de células madre mesenquimales. En comparación con la médula ósea, 1g. de tejido adiposo contiene 500 veces más células pluripotentes que 1g. de aspirado de médula ósea (Zuk P.A. y col.; 2001).



Figura 14. Obtención de células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo. Tras diversos pasos de homogenización, digestión, centrifugación y lavados se obtiene un pellet rico en células troncales ASCs (Adipose-derived Stem Cells) que puede ser cultivado. Fuente: Meruane M. y col.; 2010.

En la literatura hay mucha confusión en lo que concierne a la nomenclatura de las células madre multipotentes del estroma del tejido adiposo. Hay estudios en la literatura sobre poblaciones celulares de SVF mezcladas consideradas como células madre de tejido adiposo, estudios que definen las células madre de tejido adiposo como una subpoblación funcionalmente distinta de las células de SVF, investigaciones en las cuales los autores no aclaran si el trabajo está llevado a cabo con la fracción SVF completa o sólo con una subpoblación de ella... Además, la fracción SVF es analizada como un preparado celular en fresco o, en otras ocasiones, tras varios pases, lo que hace que en cualquier instancia, las condiciones de cultivo sean diferentes (Nae S. y col.; 2013). En 2009 se propuso el término de células del estroma derivadas de tejido adiposo (ADSC: adipose tissue-derived stromal cells) para la población celular que tras sembrar la SVF comienza a elongarse y a adherirse al plástico de la placa de cultivo y que incluye células vasculares (pericitos y progenitores endoteliales, células progenitoras de adipocitos

(preadipocitos) y células madre mesenquimales multivalentes, además de células sanguíneas circulantes, fibroblastos, células endoteliales, células musculares lisas y células inmunes (macrófagos y linfocitos) (Madonna R. y col.; 2009). Estas células pueden ser purificadas usando una combinación de pasos de lavado y expandidas en cultivo con medios similares a aquellos usados para las células madre mesenquimales de medula ósea (Bourin P. y col.; 2013). Las ADSCs son menos heterogéneas que las SVFs e incluyen células madre mesenquimales multipotentes que poseen la capacidad de diferenciarse, *in vitro*, hacia células con linaje mesenquimal, incluyendo adipocitos, osteoblastos, condrocitos y mioblastos (Zuk P.A. y col.; 2002).

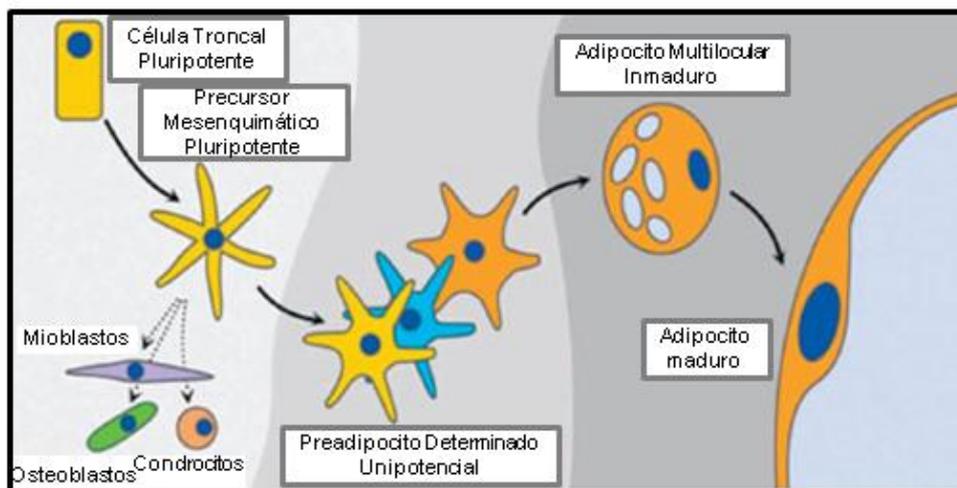


Figura 15. Secuencia de diferenciación del adipocito. Las células troncales mesenquimales (MSCs: Mesenchymal Stem Cells) son las precursoras pluripotentes de origen mesodérmico que se encuentran en el tejido adiposo adulto y pueden diferenciarse a otro linaje mesodérmico además de hacia adipocitos (pueden dar origen a tejidos de la misma capa embrionaria como serían tejido muscular, óseo o cartilaginoso). Fuente: Meruane M. y col.; 2010.

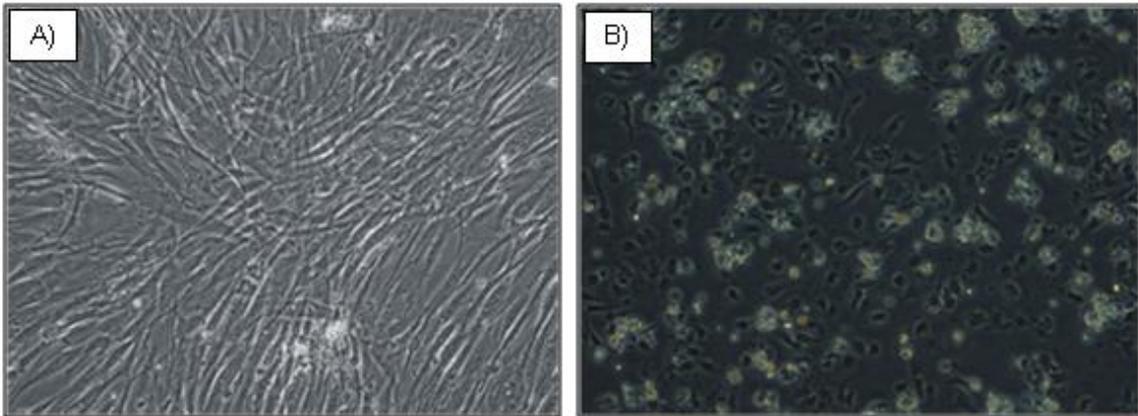


Figura 16. Células madre mesenquimales de Tejido Adiposo. A) Cultivo primario de ADSC, 10 días después del cultivo, ampliación 10x, microscopio de contraste. La heterogénea población de ADSC representa el primer paso de la obtención de células madre de tejido adiposo. B) Células madre indiferenciadas de tejido adiposo (ASC: Adult Stem Cells). Ampliación 10x. Las células madre de tejido adiposo incluyen sólo células madre mesenquimales y progenitores vasculares y de adipocitos. Fuente: Nae S. y col.; 2013.

Finalmente, para evitar controversias en la nomenclatura, la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT) concluyó que el término “célula troncal” para denominar a estas células que comienzan a elongarse adheridas al plástico de la placa de cultivo no tiene mucho soporte, y se sugirió utilizar el término “células estromales mesenquimáticas multipotentes”, pudiendo utilizar el mismo acrónimo que ya estaba arraigado, MSCs (mesenchymal stem cells), pero con esa connotación terminológica (Horwitz E.M. y col.; 2005). Según esto, el término correcto para las células troncales derivadas del tejido adiposo sería, por tanto, “células estromales derivadas de tejido adiposo” (ADSCs), pero lo más común actualmente es denominarlas ASCs como acrónimo y BM-MSCs a las células troncales derivadas de la médula ósea, aunque a éstas últimas se les sigue denominando MSCs de forma genérica (Meruane M. y col.; 2010).

La ISCT ha establecido ciertos criterios para poder denominar a una célula como MSC:

Criterios para identificar MSCs (Dominici M. y col.; 2006):			
1	Adherencia al plástico en condiciones estándar de cultivo celular		
2	Fenotipo:	Positivo ($\geq 95\%$)	Negativo ($\leq 2\%$)
		CD105	CD45
		CD73	CD34
		CD90	CD14/CD11b
			CD79 α /CD19
			HLA-DR
3	Diferenciación <i>in vitro</i> : osteoblastos, adipocitos, condroblastos (demostrado por tinción de cultivo celular)		

La adherencia al plástico es una propiedad bien definida de las células madre mesenquimales, incluso subconjuntos de células madre mesenquimales han mostrado mantener esta propiedad (Colter D.C. y col.; 2000. Jiang Y. y col.; 2002). Mediante condiciones de cultivo muy específicas las células madre mesenquimales pueden ser mantenidas y expandidas sin adherencia (Baksh D. y col.; 2003) pero si se mantienen bajo condiciones estándar de cultivo, se espera que manifiesten su adherencia al plástico.

La expresión de antígenos de superficie es una técnica que permite una rápida identificación de la población celular que se tiene en estudio. El segundo de los criterios que propone la Sociedad Internacional de Terapia Celular para

la caracterización *in vitro* de células madre mesenquimales es la determinación de la expresión de los antígenos CD105, CD73 y CD90 y, como criterio adicional para asegurar que la heterogénea población de células madre no es confundida con otros tipos celulares, se recomienda excluir las células más susceptibles de ser encontradas en los cultivos de células madre mesenquimales mediante ausencia de los marcadores hematopoyéticos CD45, CD34, CD14 o CD11b, CD79 o CD19 y HLA-DR (Dominici M. y col.; 2006). CD105 (endoglina) es una glicoproteína de membrana que forma parte del complejo del receptor del factor de crecimiento transformante β (TGF- β : (Transforming Growth Factor- β), citoquina pleiotrópica involucrada en la proliferación, diferenciación y migración celular (Banas A. y col.; 2007). CD73 (ecto-5'-nucleotidasa) es una proteína de la membrana plasmática que cataliza la conversión de los nucleótidos extracelulares a nucleósidos permeables a la membrana y es utilizada como determinante para la diferenciación de linfocitos (de Schauwer C. y col.; 2011). CD90 (Thy-1) es una glicoproteína de superficie celular que ha sido identificada como marcador de varios tipos de células madre, incluidas células madre cancerosas (He J. y col.; 2012). CD45 (PTPRCAP) es un marcador leucocitario, CD34 es un marcador de progenitores hematopoyéticos primitivos y de células endoteliales, CD14 y CD11b (ITGAM) están prominentemente expresados en monocitos y macrófagos, las células hematopoyéticas más frecuentemente encontradas en cultivos de células madre mesenquimáticas, CD79 α y CD19 son marcadores de células B y las moléculas HLA-DR no se expresan en células madre mesenquimales a menos que estén estimuladas (Dominici M. y col.; 2006). Tan

sólo es necesario testar uno de los dos marcadores para macrófagos y para células B.

Finalmente, la propiedad biológica que la mayoría de los investigadores identifica únicamente es la capacidad que tienen las células mesenquimales para diferenciarse hacia osteoblastos, adipocitos y condroblastos utilizando condiciones estándar de cultivo *in vitro* para diferenciación de tejidos (Dominici M. y col.; 2006).

Las células estromales derivadas de tejido adiposo (ADSCs/ASCs) cumplen dichos criterios. Además, una de las propiedades funcionales de las ASCs es que secretan potentes factores de crecimiento como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), el factor de crecimiento hepatocítico (HGF) y el factor de crecimiento similar a la insulina (IGF), especialmente en respuesta a hipoxia (Rehman J. y col.; 2004), y el factor de necrosis tumoral (TNF) (Wang M. y col.; 2006).

Se ha descrito la presencia de células madre hematopoyéticas en la fracción del estroma vascular del tejido adiposo de roedores (Cousin B. y col.; 2003). Estas células del estroma derivadas de tejido adiposo humano y de ratón murino han mostrado liberar gran cantidad de potentes factores angiogénicos y diferenciar hacia células endoteliales (Miranville A. y col.; 2004. Moon M.H.; 2006).

En los últimos tiempos se están incrementando las evidencias que indican que las células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo pueden sobrevivir tras trasplantarse en las áreas dañadas y posteriormente proliferar y diferenciarse hacia células miocárdicas mejorando la función del corazón (Li L. y col.; 2014). Se ha mostrado que el trasplante local y sistémico de ADSCs en modelos animales de isquemia en los miembros traseros y de infarto de miocardio permite un incremento en el número de nuevos vasos sanguíneos y mejora la perfusión sanguínea dentro del tejido dañado (Miyahara Y. y col.; 2006. Nakagami H. y col.; 2006. Cai L. y col.; 2009) Para intentar explicar la capacidad de las ADSCs para estimular la angiogénesis, se han considerado diferentes mecanismos. En primer lugar, estas células producen múltiples factores angiogénicos que activan la migración y proliferación de células endoteliales y sus progenitores para la formación de nuevos vasos (Rehman J. y col.; 2004. Madonna R. y col.; 2010). En segundo lugar, las ADSCs secretan activadores del plasminógeno y proteasas de matriz que inicia la remodelización de la matriz extracelular puesto que para la migración celular es necesaria la formación de la pared vascular y la liberación de los factores angiogénicos secuestrados en la matriz extracelular (Kachgal S. y col.; 2011). En tercer lugar, las ADSCs pueden diferenciarse hacia células musculares lisas y células endoteliales y estabilizan los nuevos vasos formados por funcionar como pericitos (Miranville A. y col.; 2004). También participan en sinergia con las células endoteliales en la formación *in vivo* de nuevos vasos a partir de la vasculatura preexistente ya que potencian la regeneración tisular por aceleración de la angiogénesis (Komiyama S. y col.; 2013). Estos datos van en la línea del paradigma de que las células madre mesenquimales se localizan en

el espacio perivascular dentro de todos los tejidos y juegan un importante papel en el desarrollo y remodelización de la red vascular, en condiciones tanto normales como patológicas (Nombela-Arrieta C. y col.; 2011). Todo ello sugiere que las células madre derivadas de Tejido Adiposo podrían ser una opción terapéutica muy valiosa en el crecimiento y la reparación del tejido vascular en diversos entornos clínicos.

El tejido adiposo constituye una ideal fuente de células madre mesenquimales debido a que está disponible de manera abundante y las ADSCs son fácilmente accesibles en grandes cantidades con mínima invasión en comparación con las derivadas de médula ósea. (Gimble J.M. y col.; 2011). Además, la posibilidad de obtener fácilmente una preparación celular autóloga para inyección es un factor a tener en cuenta para el uso terapéutico de las mismas, lo cual convierte al tejido adiposo en una opción muy atractiva con tremendo potencial en el campo de la neovascularización terapéutica. No obstante, hay un aspecto a tener en cuenta en su uso. Las ADSCs, han mostrado secretar diversos factores angiogénicos y mejorar la vascularización de tejidos isquémicos. Estimulan la formación de tubos capilares secretando factores angiogénicos y endoteliales como factor de crecimiento endotelial vascular, factor de crecimiento plaquetario y angiopoyetina-1, entre otros, sin embargo, la edad, disminuye las propiedades angiogénicas de estas células por menor secreción de factores pro-angiogénicos, lo cual restringe un poco la efectividad de la terapia celular autóloga con ADSCs en pacientes de edad avanzada. (Efimenko A. y col.; 2014).

Por otro lado, para el uso de estas terapias debemos considerar que, a pesar de no contar con los problemas de rechazo celular ni de formación de tumores, no se conoce con exactitud cómo se da el proceso de regeneración mediante el uso de trasplantes de células madre, así como también son desconocidos en profundidad los mecanismos moleculares y biológicos que conforman el proceso de diferenciación celular. Para reparar o regenerar un tejido que se encuentra dañado de forma segura y con éxito es necesario comprender cómo se formó exactamente en primer lugar dicho tejido. En este proceso parece claro que están implicadas las células madres, pero se desconoce, en gran medida, cuál es su intervención.

ESTUDIOS PREVIOS DEL GRUPO DE INVESTIGACIÓN

Derivados de los primeros estudios realizados por nuestro grupo de investigación, se han obtenido dos publicaciones científicas:

- Salas J., Montiel M., Jiménez E., Valenzuela M., Valderrama J.F., Castillo R., González S., El Bekay R. (2009). Angiogenic properties of adult human thymus fat. *Cell Tissue Res. Nov;338(2)*:313-8.
- Tinahones F., Salas J., Mayas M.D., Ruiz-Villalba A., Macias-Gonzalez M., Garrido-Sanchez L., De Mora M., Moreno-Santos I., Bernal R., Cardona F., El Bekay R. (2009). VEGF gene expression in adult human thymus fat: a correlative study with hypoxic induced factor and cyclooxygenase-2. *PLoS One. Dec 14;4(12)*:e8213.

En ellos, nuestro grupo ha descubierto que la grasa tímica es una potente fuente de angiogénesis en comparación con la grasa subcutánea ya que produce una variedad de factores angiogénicos tales como angiopoyetina (que promueve la angiogénesis y la remodelización vascular -Klagsbrun M. y col.; 1996-), Tie2, VEGF (poniendo de manifiesto propiedades tanto angiogénicas como linfangiogénicas, éstas últimas quizás relacionadas con la actividad estromal linfopoyética de los corpúsculos de Hassall's -Chinen J. y col.; 2006-), VEGF-R1 y VEGF-R2. Además, las células endoteliales de cordón umbilical humano (HUVEC) cultivadas en presencia de extractos de grasa tímica mostraron una potenciada respuesta proliferativa y migratoria, dos pasos relevantes en la angiogénesis, sugiriendo la capacidad angiogénica del Tejido Adiposo de Timo (TAT) (Salas J. y col.; 2009).

También se ha mostrado que el tejido adiposo de timo manifiesta mecanismos inflamatorios y anti-inflamatorios o citoprotectores similares a aquéllos observados en otros tejidos adiposos, incluyendo al tejido adiposo subcutáneo. VEGF-A es la isoforma más expresada en la grasa tímica y esta expresión parece estar regulada por el factor inducible por la hipoxia α (HIF-1 α). La expresión de este factor angiogénico también parece estar asociada con la activación de los mecanismos que implican a la ciclooxigenasa-2 (COX-2: reguladora de procesos inflamatorios) y a la hemooxigenasa-1 (HO-1; proteína citoprotectora) (Tinahones F. y col.; 2009). En algunos tejidos adiposos blancos muchos autores han explicado que la activación de VEGF implica la activación génica de COX-1 a través de HIF-1 α (Solban N. y col.; 2006).

Posteriormente, cuando nuestro grupo comparó la grasa tímica con el tejido adiposo subcutáneo del mismo individuo, se encontró un perfil de expresión similar respecto a los factores mediadores de la adipogénesis y la angiogénesis (PPAR γ 1/ γ 2, FABP-4 y adiponectina, y VEGF-A, B, C y D) sugiriendo que la grasa tímica podría tener la misma funcionalidad que la de cualquier otro tejido adiposo. Además, mediante métodos de inmunohistoquímica y por citometría de flujo se pudo observar que la grasa tímica tiene una gran variabilidad celular, constituyendo un alto porcentaje de ellas adipocitos maduros, un 15% células endoteliales, el 0,25% macrófagos, y sólo un porcentaje muy bajo, timocitos. Este perfil celular es similar al observado en otros tejidos adiposos blancos tales como el subcutáneo pudiéndose hablar, por tanto, de generación de nuevo tejido adiposo que

reemplaza a la anterior generación de timocitos, más que de un proceso de involución o degradación glandular. (Tinahones F. y col.; 2009).

Podemos concluir que la grasa de timo adulta es una interesante fuente de factores angiogénicos previamente inapreciada, que puede tener en el futuro un papel relevante promoviendo la angiogénesis y la reparación tisular. Muchos estudios han mostrado que el timo pierde su función durante la vejez. Con los datos obtenidos previamente podríamos decir que el timo reemplaza su función inmune por otra que es la de ser y funcionar como un tejido adiposo blanco ordinario.

Puede resultar curioso el hecho de por qué usar la grasa de timo (TAT) como fuente angiogénica si se tiene acceso, quizás más fácil, a otras grasas del cuerpo tales como los tejidos adiposos subcutáneo (TAS) y visceral (TAV). En primer lugar, los resultados respecto a niveles angiogénicos detectados previamente en esta grasa indican que merece la pena su estudio en profundidad para investigar su potencial utilidad como un novedoso tejido adiposo. Además, como ya se ha mencionado, parte de esta grasa es desechada durante la cirugía en los procedimientos de canulación en pacientes con necesidad de un bypass cardiopulmonar por isquemia cardíaca y, no aparecen efectos adversos sobre quitar esta grasa, ya que en nuestra experiencia clínica hemos observado que este procedimiento no presenta complicaciones quirúrgicas ni morbilidades asociadas a su eliminación. Por otro lado, la mayor fuente de tejido adiposo de timo la constituyen los pacientes isquémicos ya que son los sometidos a la cirugía cardiovascular, un

procedimiento frecuentemente usado por los cirujanos cardíacos (Rathore K.S. y col.; 2009. Pacifico A.D. y col.; 1986). Es más, casi todos los estudios realizados sobre grasa de timo y su función están basados en la escisión y eliminación de dicho tejido durante las intervenciones cardíacas, lo cual muestra cómo esta práctica se lleva a cabo de forma rutinaria de manera segura.

Esta grasa podría proporcionar en un futuro la ayuda para la neovascularización cardíaca que necesitan muchos pacientes que no pueden beneficiarse de los tratamientos de revascularización coronaria disponibles.

HIPÓTESIS:

El tejido adiposo de timo (TAT) y sus células derivadas (células madre mesenquimales y progenitoras endoteliales derivadas del TAT), gracias a su potencial de diferenciación y su capacidad proangiogénica y antiapoptótica, pueden servir como fuente de angiogénesis de gran utilidad, en comparación con un tejido adiposo comúnmente usado para ese tipo de terapias como es el tejido adiposo subcutáneo, para ayudar en la neo-formación de los vasos sanguíneos y regeneración de los tejidos isquémicos en pacientes de edad avanzada con isquemia cardíaca.

La grasa tímica podría ser una novedosa fuente de factores con gran capacidad para inducir la angiogénesis y un tejido del que obtener células madre mesenquimales y progenitoras endoteliales que ayudasen a la neoformación de vasos sanguíneos y a la regeneración de tejidos isquémicos.

OBJETIVOS

OBJETIVOS:

- Análisis de expresión de parámetros endoteliales angiogénicos, especialmente los conocidos por jugar un papel relevante en la angiogénesis y generación de nuevos vasos sanguíneos como es el sistema de los factores de crecimiento endotelial vascular (VEGFs), haciendo una comparativa entre el TAT y el TAS.
- Expresión génica de los típicos parámetros adipogénicos en los tejidos adiposos tanto de timo como subcutáneo.
- Evaluación de cómo afecta el incremento de la edad a los niveles de angiogénesis en ambas grasas. Estudio comparativo de la capacidad angiogénica a diferentes edades en ambos tejidos adiposos, TAT y TAS, para intentar determinar a qué edad se afectan las propiedades angiogénicas.
- Caracterización de las diferentes poblaciones de células madre mesenquimales procedentes de Tejido Adiposo de Timo y Subcutáneo.
- Estudio de la capacidad de diferenciación de estas células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo tímico y subcutáneo hacia adipocitos, osteocitos y células endoteliales, así como de los mecanismos moleculares reguladores de la misma.
- Valoración de la capacidad de formación de túbulos por parte de células endoteliales procedentes de la vena safena humana (HSaVEC) en medio condicionado generado por cultivo de células procedente de la fracción vascular estromal derivada de ambos tejidos adiposos, TAT y TAS.

MATERIALES Y MÉTODOS

Estudio 1: Análisis y comparación de los niveles de expresión de parámetros endoteliales, angiogénicos y adipogénicos en TAT y TAS en relación con el incremento de la edad.

PACIENTES Y RECOGIDA DE TEJIDO ADIPOSO:

El estudio reclutó pacientes que recibieron injerto de bypass artero-coronario (CABG) con bypass cardio-pulmonar (CBP) en el Hospital Regional Universitario Carlos Haya de Málaga. La media del número de injertos usados fue de 3,1 por paciente. Los sujetos operados y reclutados en este estudio fueron individuos con situación estable y sin lesión isquémica severa. Por tanto, estos sujetos no habían sufrido infarto durante su vida o, al menos, no lo habían sufrido 6 meses antes de la cirugía. Además, ninguno de los sujetos de este estudio sufrió de arteriopatía periférica isquémica de las piernas lo cual también podría alterar la expresión génica de los factores angiogénicos.

El estudio fue llevado a cabo realizando dos grupos de pacientes:

- Grupo de mediana edad: desde 45 años hasta 65 años.
- Grupo de tercera edad: 70 años aproximadamente.

El número total de pacientes reclutados para el análisis de la expresión de ARN y para el análisis proteico fue de N=35.

- Grupo de mediana edad: N=18.
- Grupo de tercera edad: N=17.

Para el estudio de citometría, el número total de pacientes con similares características clinicopatológicas fue de N=12:

- Grupo de mediana edad: N=6.
- Grupo de tercera edad: N=6.

Para determinación de la capacidad del TAT y TAS para estimular la angiogénesis mediante ensayo *in vivo* sobre la membrana corioalantoidea de codorniz (Chorioalantoic Membrane – CAM) el número de pacientes fue de N=5.

Este estudio fue aprobado por el comité ético local del Hospital Regional Universitario Carlos Haya, y todos los pacientes participantes firmaron el pertinente consentimiento informado (adjunto al final de este apartado) elaborado por la Sociedad Española de Cirugía Torácica y Cardiovascular (SECTCV).

Ambos tejidos adiposos, tanto el subcutáneo como el de timo, fueron obtenidos al inicio del procedimiento quirúrgico y antes del paro del corazón. El sitio de recogida de la grasa subcutánea fue la propia incisión del pecho. Para el análisis de expresión de ARN y el análisis proteico, los tejidos se almacenaron inmediatamente a -80°C tras su traslado a laboratorio en medio salino suplementado (Hank's balanced Salt Solution -Sigma; H9269-enriquecida con penicilina/estreptomicina al 3% -Sigma; P0781- y anfotericina al 1% -Sigma; A-2942-). Para la realización de citometría de flujo se procesó el tejido en fresco.

EXTRACCIÓN DE ARN:

El ARN total fue aislado del tejido adiposo mediante el método de aislamiento de ARN con Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA) y purificado con el kit RNeasy® Lipid Tissue Mini kit (Cat. N° 74804, QUIAGEN, Valencia, CA).

El protocolo utilizado fue el siguiente:

Nota: Trabajar dentro de la campana de flujo laminar y con las muestras en hielo durante todo el tiempo que dura la extracción (el ARN se degrada a temperatura ambiente). Limpiar bien el material y ponerlo unos minutos bajo la luz UV de la campana para esterilizar.

1. Sacar las muestras del congelador de $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ y ponerlas en nieve carbónica inmediatamente para que se mantengan congeladas. Cortar trozos de unos 100 mg. aproximadamente y guardar a -80°C el resto que no se vaya a utilizar.
2. Añadir 1 mL. de Trizol. Homogeneizar el tejido con el homogeneizador en intensidad 6, y pasar los eppendorfs homogeneizados a hielo. Limpiar el homogeneizador entre muestra y muestra haciendo un pase por NaOH 0.5 N, y dos por H_2O destilada (utilizar 3 recipientes y hacer un lavado del homogeneizador en cada uno de ellos).
3. Incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos.
4. Añadir 200 μL de cloroformo y agitar las muestras vigorosamente por 15 segundos (ponerlas en la gradilla y agitar fuertemente con las propias manos).
5. Incubar a temperatura ambiente durante 3 minutos.
6. Centrifugar a 4°C y 12000 xg durante 15 minutos.
7. Tras la centrifugación, tomar con una pipeta el sobrenadante transparente que es el que contiene el ARN. Pasarlo a un eppendorf limpio y añadir, la misma cantidad que se haya tomado de sobrenadante, de etanol al 70% (aproximadamente 700 μL).

Girar los eppendorfs suavemente con la mano para que todo se mezcle.

8. Pipetear un poco el ARN-etanol-70% y pasarlo a las columnas de extracción del kit. En éstas caben aproximadamente 700 μ L, así que se añade un primer volumen, se centrifuga a 4°C y 8000 xg durante 15 segundos, se tira el eluído pasado por la columna y se repite con el resto de volumen que no cabía en la columna. Tras esta segunda centrifugación, se cambia el tubo recolector de la columna tirando el eluído.
9. Añadir 350 μ L del Buffer RW1 a las columnas con las muestras.
10. Centrifugar a 4°C y 8000 xg durante 15 segundos.
11. Cambiar el tubo recolector de la columna descartando el eluído.
Preparar el mix que contiene la enzima DNasa (RNase Free DNase Set; Cat. N° 79254, QUIAGEN): 10 μ L DNasa/muestra + 70 μ L RDD/muestra, y añadir al centro de cada columna 80 μ L de éste.
12. Incubar a temperatura ambiente durante 15 minutos.
13. Añadir 350 μ L del Buffer RW1 a las columnas con las muestras.
Centrifugar a 4°C y 8000 xg durante 15 segundos.
14. Cambiar el tubo recolector de la columna tirando el eluído.
Preparar Buffer RPE (0.8 mL etanol absoluto/muestra + 0.2 mL RPE/muestra; siempre se hace en el momento) y añadir 500 μ L de lo preparado a cada muestra.
15. Centrifugar a 4°C y 8000 xg durante 15 segundos.

16. Descartar el eluido y añadir otros 500 μ L del Buffer RPE (ya preparado con las cantidades del paso anterior).
17. Centrifugar a 4°C y 8000 xg durante 2 minutos. Cambiar el tubo recolector de la columna tirando el eluido.
18. Centrifugar a 4°C y 13000 xg durante 1 minuto. Dejar los tapones de las columnas abiertas para que éstas se sequen por completo en su interior.
19. Pasar las columnas a eppendorfs de 1.5 mL. Añadir 30 μ L de H₂O RNasa free al centro de las columnas y centrifugar a 4°C y 8000 xg durante 1 minuto.
20. Tirar las columnas; nos quedamos con lo decantado a los eppendorfs (ahí está el ARN) los cuales hay que rotularlos debidamente. Introducirlos rápidamente en hielo. El ARN se guarda a -80 °C tras su cuantificación.

CUANTIFICACIÓN DE ARN:

El ARN total fue cuantificado mediante la utilización del espectrofotómetro ND-1000 (NanoDrop® ND-1000). Las correspondientes concentraciones de ARN fueron determinadas por absorbancia a 260 nm (A₂₆₀) y su pureza fue estimada mediante los valores del ratio A₂₆₀:A₂₈₀ (un ratio de ~2.0 es generalmente aceptado como puro para ARN; un ratio menor puede ser indicativo de la presencia de proteínas, fenoles u otros contaminantes que absorben con fuerza, o cercanos, a los 280 nm) y del ratio A₂₆₀/230 (este ratio es usado como una medida secundaria de la pureza de los ácidos nucleicos, los valores esperados para éste están dentro del rango

2.0 - 2.2; si este ratio es apreciablemente menor al esperado, esto puede ser indicativo de la presencia de contaminantes que absorben a 230 nm).

El volumen utilizado para la realización de la cuantificación fue de 2 μ L.

RETROTRANSCRIPCIÓN (RT):

Según las concentraciones de ARN obtenidas se utilizaron 4, 2 ó 1 μ g del ARN total para la síntesis de ADNc. La reverso-transcripción fue realizada en el termociclador (2720 Thermal Cycler; Applied Biosystems) usando la enzima reverso-transcriptasa (Transcriptor Reverse Transcriptase 20U/ μ L; 03531287001; Roche).

El protocolo utilizado se divide en dos fases principales (RT-1 y RT-2) y fue el siguiente:

Nota: Trabajar con las muestras en frío. Limpiar bien el material y evitar pasar con los brazos por encima de las muestras para evitar contaminaciones.

1. RT-1. Fase preparativa de la retrotranscripción en la cual los primers se alinean con el ARN. En ésta es necesario añadir:
 - a. *ARN* (se añadirá un volumen en el cual al final tengamos una cantidad total de ARN de 4, 2 ó 1 μ g; esto irá en función de que la cantidad de ARN obtenida en la extracción sea mayor o menor).
 - b. *Random primers* (añadir en igual cantidad que el ARN, es decir, 4, 2 ó 1 μ g de random primers).
 - c. *H₂O RNasa free* (hasta completar un volumen final de 58 μ L en el caso de RT-1 de 4 μ g de ARN, un volumen final de 29 μ L en el caso de RT-1 de 2 μ g de ARN y un

volumen final de 14.50 μL en el caso de RT-1 de 1 μg de ARN).

- d. Encender el termociclador. Introducir en él todos los tubos asegurándonos de que están bien cerrados para que así no se evapore nada de las muestras. Aplicar las siguientes condiciones experimentales:

	PASO 1	PASO 2	PASO 3
Temperatura	65 °C	4 °C	4 °C
Tiempo	10 min	5 min	Mantenimiento

2. RT-2. En esta fase ya comienza la retrotranscripción en sí. Mientras están las muestras en el termociclador en RT-1 se debe preparar un mix que contenga:

- a. *Buffer*: 16 μL en el caso de RT-1 de 4 μg de ARN, 8 μL en el caso de RT-1 de 2 μg de ARN y 4 μL en el caso de RT-1 de 1 μg de ARN.
- b. *dNTP*: 4 μL en el caso de RT-1 de 4 μg de ARN, 2 μL en el caso de RT-1 de 2 μg de ARN y 1 μL en el caso de RT-1 de 1 μg de ARN.
- c. *Inhibidor*: 1 μL en el caso de RT-1 de 4 μg de ARN, 0.5 μL en el caso de RT-1 de 2 μg de ARN y 0.25 μL en el caso de RT-1 de 1 μg de ARN.

- d. *Enzima*: 1 μL en el caso de RT-1 de 4 μg de ARN, 0.5 μL en el caso de RT-1 de 2 μg de ARN y 0.25 μL en el caso de RT-1 de 1 μg de ARN.
- e. Resuspender muy bien la mezcla.
- f. Manteniendo los tubos en el termociclador sin quitar el mantenimiento a 4°C, éstos se abren y se añaden 22 μL de mix en el caso de RT-1 de 4 μg de ARN, 11 μL de mix en el caso de RT-1 de 2 μg de ARN y 5.5 μL de mix en el caso de RT-1 de 1 μg de ARN.
- g. Parar el programa anterior y aplicar las siguientes condiciones experimentales:

	PASO 4	PASO 5	PASO 6	PASO 7
Temperatura	25 °C	42 °C	70 °C	4 °C
Tiempo	10 min	60 min	30 min	Mantenimiento

CUANTIFICACIÓN DE ADNc:

El volumen final que se obtiene de ADNc tras la retrotranscripción es de:

- 80 μL de ADNc en el caso de RT de 4 μg de ARN.
- 40 μL de ADNc en el caso de RT de 2 μg de ARN.
- 20 μL de ADNc en el caso de RT de 1 μg de ARN.

Siendo en todos los casos la concentración de ADNc resultante de 0.05 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (50 $\text{ng}/\mu\text{L}$). La pureza de ADNc fue estimada mediante la utilización del espectrofotómetro ND-1000 (NanoDrop® ND-1000) gracias a los valores del

ratio A260:A280 (un ratio de ~1.8 es generalmente aceptado como puro para ADN; un ratio menor puede ser indicativo de la presencia de proteínas, fenoles u otros contaminantes que absorben con fuerza, o cercanos, a los 280 nm) y del ratio A260/230 (este ratio es usado como una medida secundaria de la pureza de los ácidos nucleicos, los valores esperados para éste están dentro del rango 2.0 - 2.2; si este ratio es apreciablemente menor al esperado, esto puede ser indicativo de la presencia de contaminantes que absorben a 230 nm).

El volumen utilizado para la realización de la cuantificación fue de 2 µL.

REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA A TIEMPO REAL (RT-PCR):

Las amplificaciones para los estudios de comparación de los niveles de expresión génica entre los diferentes sujetos de estudio se realizaron utilizando placas de reacción de 96 pocillos (MicroAMP® Optical 96-well reaction plate; PE Applied Biosystems) en un equipo de PCR a tiempo real tipo 7500 Fast (ABI 7500 Fast Real-Time PCR System; Applied Biosystems).

Las reacciones de PCR cuantitativas se llevaron a cabo para todos los genes usando un volumen final de 25 µl consistentes en: 11.25 µl del ADNc cuantificado diluido (éstos 11.25 µl deben contener 12.5 ng de ADNc para que así la concentración final de éste por pocillo sea de 0.5 ng/ µl –volumen recomendado por la casa comercial-) y 13.75 µl de mezcla de reacción (compuesta por 12.5 µl de Universal PCR Master Mix - 4364341; Applied Biosystems - y 1.25 µl de la correspondiente sonda de expresión génica específica -TaqMan® Gene Expression Assays; Applied Biosystems-). Sondas utilizadas:

- VEGF-A: Hs00173626_m1
- VEGF-B: Hs00957984_m1
- VEGF-C: Hs00153458_m1
- VEGF-D: Hs01128659_m1
- VEGF-R1/FLT1: Hs 01052935_m1
- VEGF-R2/KDR/Flk-1: Hs00176676_m1
- VEGF-R3/FLT4: Hs01047674_m1
- CD90/Thy-1: Hs00264235_s1
- CD31/PCAM-1: Hs01065279_m1
- CD49a/VLA1: Hs00168433_m1
- CD29: Hs00559595_m1

Todas las medidas se realizaron por duplicado. Durante los ciclos de amplificación el valor Ct para cada producto de amplificación fue determinado usando un valor umbral de 0.1. Las señales específicas fueron normalizadas según la expresión constitutiva del gen de la ciclofilina (Cyc: 4326316E), usando la fórmula $2^{-\Delta Ct}$.

El protocolo utilizado fue el siguiente:

Nota: Trabajar a 4°C durante todo el tiempo, utilizando una placa de frío puesto que la lectura de las placas de reacción se hace por su parte posterior y no deben estar mojadas por el hielo. Uso de puntas con filtro para minimizar contaminaciones y, por tanto, amplificaciones inespecíficas.

1. Preparar “x” eppendorfs con las mezclas de reacción que vamos a necesitar (siendo “x” el número de genes que pretendemos cuantificar en cada placa): 12.5 µl de Master Mix / muestra + 1.25

µl de sonda / muestra. Homogeneizar bien mediante pipeteo e introducir en hielo.

2. Añadir a cada pocillo 13.75 µl de las mezclas de reacción preparadas sin llegar al tope de la pipeta para así tener la máxima homogeneidad de volumen en los pocillos y minimizar los errores cometidos por pipeteo.
3. Añadir a continuación 11.25 µl de las muestras (ADNc diluido) o de H₂O RNasa free en aquellos pocillos que actúan como blanco.
4. Tapar bien todos los pocillos (MicroAmp Optical Adhesive Film; referencia: 4311971; Applied Biosystems).
5. Dar un *spin* a la placa de reacción (llegar hasta las 3200 rpm y dejar que termine la centrifugación; centrífuga a 4°C, sin freno).
6. Introducir la placa de reacción en el termociclador y aplicar los siguientes ciclos de reacción:

	Holding Stage Step 1	Holding Stage Step 2	Cicling Stage Step 1	Cicling Stage Step 2
Temperatura	50°C	95°C	95°C	60°C
Tiempo	2 min	10 min	00:15 min	1 min

Número de ciclos: 40

EXTRACCIÓN PROTÉICA:

Las proteínas totales de los tejidos adiposos fueron extraídas según el protocolo *NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents protocol* (Pierce Biotechnology, referencia nº 78833).

Los reactivos del kit son:

- CER I (10 mL): reactivo I de extracción de proteínas del citosol.
- CER II (550 μ L): reactivo II de extracción de proteínas del citosol.
- NER (5mL): reactivo de extracción de proteínas nucleares.

El protocolo utilizado fue el siguiente:

Nota: Trabajar en hielo en todo momento (proteasas, fosfatasas... son más activas a altas temperaturas, por ello es conveniente trabajar en hielo) y añadir los reactivos previamente enfriados. Todas las centrifugaciones se hacen a 4°C y a máxima potencia.

1. Cortar ~50 mg de tejido adiposo en trozos pequeños; introducirlos en un tubo o eppendorf estéril (en función de la cantidad inicial de tejido tendremos mayor o menor eficiencia final; se puede utilizar de 40 a 100 mg de tejido). Añadir 500 μ L de agua y pipetear durante 20". Añadir rápidamente 500 μ L de NaCl al 1.8% y pipetear (acabamos de crear un suero de NaCl al 0.9%). Este choque osmótico se hace para romper los posibles eritrocitos que haya en la muestra (no es necesario hacerlo en todas las ocasiones; depende de la muestra), por lo que reducimos significativamente la contaminación posterior con glóbulos rojos y grasa.
2. Dar un spin para bajar el tejido; quitar el suero con una jeringa de insulina con cuidado de no arrastrar tejido y dejarlo lo más seco posible.
3. Resuspender el pellet en 200 μ L de CER I frío. Añadir 2 μ L de cocktail inhibidor de fosfatasas número 2 (Sigma-Aldrich; Product

Number: P5726) y 2 μ L de cocktail inhibidor de fosfatasa número 3 (Sigma-Aldrich; Product Number: P0044). No es necesario resuspender (a continuación se homogeniza todo con la sonicación).

4. Sonicación. Siempre dentro del hielo para que no se calienten las muestras en exceso. Intensidad lo más baja posible (1-2) para romper membranas pero no los núcleos. Sonicar unos 4" cada muestra moviendo el sonicador por el eppendorf. Hacer 2 ó 3 tandas de sonicación (hasta que todo quede perfectamente homogenizado). El sonicador se lava con un trozo de papel humedecido en H₂O (se para entre cada eppendorf y se limpia un poco). Al acabar se limpia con un papel empapado en alcohol.
5. Agitar bien con el vórtex durante 15" e incubar 10 minutos en hielo.
6. Añadir 11 μ L de CER II frío (ahora no es necesario acompañarlo de los inhibidores porque aún tenemos en la disolución los añadidos anteriormente). Agitar con vórtex 5".
7. Centrifugar 10' / 14000 rpm (máxima potencia) / 4°C.
8. Tras la centrifugación, en los eppendorf encontraremos una primera capa de grasa (puede ser como un botón, se elimina si molesta mucho por simple arrastre con la jeringa; evitar cogerla), una fracción líquida que se corresponde con las proteínas citosólicas y un pellet bien pegado a la base (hay que tener más cuidado con la grasa que con la posibilidad de que el pellet se despegue). Coger una jeringa de insulina y tomar la fracción

líquida que se obtiene tras la centrifugación; será la FRACCIÓN PROTÉICA CITOSÓLICA; verterla en un nuevo tubo limpio debidamente rotulado y mantenerlo en hielo hasta guardarlo (congelar a -80°C ; alicuotado o no según posterior uso). Los eppendorfs se mantienen en frío (hielo) hasta su congelación; al estar en reposo puede aparecer una capa de grasa nuevamente en la parte superior. Dar un spin y repetir el proceso de tomar la fracción citosólica con una jeringa de insulina. Verter en un nuevo tubo limpio rotulado. Así se minimiza la contaminación por grasa de nuestra muestra.

Nota: con el choque osmótico previo se minimiza la cantidad de grasa obtenida en este paso.

9. Resuspender el pellet con 100 μL de NER frío. Añadir 1 μL de cocktail inhibidor de fosfatasas número 2 (Sigma-Aldrich; Product Number: P5726) y 1 μL de cocktail inhibidor de fosfatasas número 3 (Sigma-Aldrich; Product Number: P0044). No es necesario resuspender (a continuación se homogeniza todo con la sonicación).
10. Sonicación del pellet resuspendido en NER. Se puede subir la intensidad de sonicación (4-6) puesto que pretendemos romper los núcleos en este paso. Trabajar dentro del hielo y repetir, al menos, dos tandas de sonicación.
11. Agitar en vórtex durante 15" para mezclar todo bien tras la homogenización. Dejar incubar en hielo durante un total de 40

minutos; cada 10 minutos de este tiempo se debe hacer una agitación con el vórtex de 15”.

12. Centrifugar 10’/ 14000 rpm (máxima potencia) / 4°C.
13. Transferir el sobrenadante (FRACCIÓN PROTÉICA NUCLEAR) con una jeringa de insulina a un tubo limpio debidamente rotulado. Dejar reposar en hielo. Puede aparecer nuevamente una capa de grasa. Dar un spin y repetir el proceso de tomar la fracción proteica nuclear con jeringa. Verter en un nuevo tubo limpio rotulado. Así se minimiza la contaminación por grasa de nuestra muestra, lo cual podría interferir en posteriores experimentos.
14. Guardar la fracción nuclear a –80°C, alicuotado o no según posterior uso.
15. Eficiencia Esperada (A_{280}):
Fracción citosólica: 40 mg de tejido graso iniciales → de 7 a 13 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ($A_{260/280}$ → 0,43 – 0,9).
Fracción nuclear: 40 mg de tejido graso iniciales → de 2 a 26 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ($A_{260/280}$ → 0,88 – 1,7).

CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS. MÉTODO BRADFORD:

La cuantificación de proteínas totales de las fracciones citoplasmáticas y nucleares se realizó por el método descrito por Bradford (1976) utilizando el reactivo *Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate* (Bio-Rad. Referencia: 500-0006). Este método está basado en el cambio de absorbancia

(de 466 nm a 595 nm) que experimenta una solución ácida de “Coomassie Brilliant Blue” que está contenida en el reactivo de Bradford al unirse a las proteínas. Los datos de absorbancia fueron referidos a una curva patrón realizada con albúmina de suero bovino.

El protocolo utilizado fue el siguiente:

1. Obtención de la recta patrón:
 - a. Preparar diversos eppendorfs con una dilución 1:5 del reactivo de Bradford (800 μ L H₂O; 200 μ L Bradford).
 - b. Recta patrón: A partir del “stock” de BSA preparar eppendorfs con las concentraciones de BSA indicadas en la tabla siguiente:

Eppendorf	Concentración BSA
1	0.5 μ g/ μ L
2	1 μ g/ μ L
3	2.5 μ g/ μ L
4	5 μ g/ μ L
5	10 μ g/ μ L
6	20 μ g/ μ L
7	30 μ g/ μ L
8	40 μ g/ μ L

- c. Añadir a cada eppendorf que contiene Reactivo de Bradford diluido, 1 μ L de las diferentes concentraciones de recta patrón preparadas. Mezclar por inversión.
 - d. Incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente.

- e. Pasar 200 μL del contenido de los eppendorfs a una placa de ELISA de 96 pocillos.
 - f. Realizar la lectura de absorbancia a 595 nm y obtener la ecuación de la recta de regresión.
2. Cuantificación de nuestras muestras:
- a. Preparar nuevamente diversos eppendorfs con una dilución 1:5 del reactivo de Bradford (800 μL H_2O ; 200 μL Bradford).
 - b. Añadir a cada eppendorf que contiene Reactivo de Bradford diluido, 1 μL de nuestras muestras a cuantificar. Mezclar por inversión.
 - c. Incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente.
 - d. Pasar 200 μL del contenido de los eppendorfs a una placa de ELISA de 96 pocillos.
 - e. Realizar la lectura de absorbancia a 595 nm y calcular el contenido proteico de nuestra muestra a partir de la ecuación de la recta patrón.

Nota: Se recomienda realizar, al menos, dos réplicas tanto para el cálculo de la curva patrón como para la cuantificación de las muestras “problema”.

ANÁLISIS POR INMUNODETECCIÓN (WESTERN BLOT):

Los extractos proteicos (30 μg) fueron separados por SDS-PAGE, y transferidos a una membrana tipo PVDF (Polyvinilidene Fluoride Transfer Membrane 0.45 μm ; T81976; Pall Corporation) e incubados con los anticuerpos específicos:

- anti-VEGF (A-20): SC-152 (Santa Cruz Biotechnology)
- anti-VEGF-B (J-14I): SC-80442 (Santa Cruz Biotechnology)
- anti-VEGF-C (H-48): SC-25783 (Santa Cruz Biotechnology)
- anti-VEGF-D (x142): SC-80447 (Santa Cruz Biotechnology)
- anti-VEGF-R3/FLT4 (C-20): SC321 (Santa Cruz Biotechnology)
- anti-VEGF-R2/FLK1 (A-3): SC6251 (Santa Cruz Biotechnology)
- anti-VEGF-R1/FLT1 (C-17): SC316 (Santa Cruz Biotechnology)
- anti-FABP4: SC271529 (Santa Cruz Biotechnology)
- anti-adipose-differentiation-related protein (ADRP): SC32888 (Santa Cruz Biotechnology)
- anti-PPAR γ 2: MBS603559 (My Biosource)

Las señales proteicas fueron detectadas por electroquimioluminiscencia (Quantity One software; Bio-Rad Laboratories).

El protocolo utilizado fue el siguiente:

1. Reactivos necesarios:

- PBS 1X (Phosphate Buffered Saline; P4417-100TAB; Sigma).
- Tampón de carga de las muestras (para preparar unos 16 mL):

Agua miliQ (mL)	6
Tris 0,5 M-HCl pH 6.8 (mL)	2
SDS 10 % (mL)	3.2
B-mercaptoetanol (mL)	0.8
Azul de bromofenol 0.5% (mL)	0.8
Glicerol (mL)	3.2

- a. Agitar muy bien en el agitador magnético para conseguir una mezcla totalmente homogénea.
- b. Guardarlo en alícuotas a 4°C.
- Running Buffer 5X (ojo, se utiliza a 1X en durante la electroforesis, por lo que habrá que hacer la pertinente dilución):

Tris (g)	15
Glicina (g)	72
SDS (g)	5
Agua miliQ	Hasta 1 L.

- a. No es necesario medirle el pH.
- b. Se puede reutilizar (unas 3 veces).
- Transfer Buffer:

Running Buffer 5X (mL)	200
Metanol absoluto (mL)	200
Agua miliQ	600

- a. Se puede reutilizar (unas 3 veces).
- Tampón de bloqueo (10 mL/membrana):

PBS 1X
5% BSA
0.5% Tween 20

- Tampón de lavado (en cada lavado se debe cubrir completamente la membrana):

PBS 1X
0.5% Tween 20

- Tampón diluidor de anticuerpos (acs):

PBS 1X
0.5% Tween 20

2. Preparación del gel:

- Montar los cristales en los soportes y llenarlos con agua para comprobar que no haya escapes por la parte inferior de éstos.
- *Running Gel* (cantidades para dos geles: 10 mL). Preparar el adecuado en función del peso molecular de la proteína de nuestro interés. Como referencia se toma la β -actina, cuyo peso molecular es de 42 kDa y se corre en un gel al 10% de acrilamida (proteínas de mayor peso molecular se han de correr en un gel con un menor porcentaje de acrilamida y proteínas de menor peso molecular se han de correr en un gel con un mayor porcentaje de acrilamida).

Porcentaje final acrilamida (%)	5	7	7.5	10	12	15
Agua miliQ (mL)	6.1	5.6	5.5	4.9	4.4	3.9
Acrilamida / Bis 40% (29:1) (mL)	1.3	1.8	1.9	2.5	3	3.5
Tris 1,5 M pH 8.8 (mL)	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
SDS 10 % (μ L)	100	100	100	100	100	100
PSA 10 % (μ L)	50	50	50	50	50	50
TEMED (μ L)	10	10	10	10	10	10

- Dejar polimerizar ~20 minutos (cubrir con H₂O mientras polimeriza; observar y utilizar como referencia la polimerización de lo sobrante que queda en el bote donde se ha preparado la mezcla).
- *Stacking Gel* (cantidades para dos-tres geles: 15 mL).

Porcentaje final acrilamida (%)	4
Agua miliQ (mL)	6.4
Acrilamida / Bis 40% (29:1) (mL)	1
Tris 0,5 M pH 6.8 (mL)	2.5
SDS 10 % (μL)	100
PSA 10 % (μL)	50
TEMED (μL)	10

- Introducir el peine por el lateral para evitar la formación de burbujas.
- Dejar polimerizar ~10 minutos (observar y utilizar como referencia la polimerización de lo sobrante que queda en el bote donde se ha preparado la mezcla).

3. Muestras:

- Encender el *thermoblot* para que alcance 100 °C.
- Sacar las muestras del congelador (-20° ó -80°). Dejarlas descongelar e introducir las en hielo hasta su utilización.
- Mezclar las muestras con el tampón de carga (está alicuotado a 4 °C) en una proporción 2x ó 3x (por ejemplo 10 μL muestra + 10 μL tampón de carga). ¡Ojo! normalmente se preparan dos geles (uno para el gen de la β-actina, que es el que se utiliza de referencia, y otro para

nuestra proteína de interés), por lo que habrá que preparar el doble de muestra con su consiguiente tampón de carga.

- Incubar en agitación: 5 minutos, 100 °C, 800 rpm. Hacer un agujero en los eppendorfs con una jeringa de insulina para que con el calor no salten los tapones.
- Centrifugar 5 minutos, 13000 xg. Evitar el pellet al cargar las muestras en el gel ya que se trata de suciedad o de grumos que se hayan formado.

4. Electroforesis:

- Sacar el gel del soporte una vez haya terminado de polimerizar; quitar el peine. Enjuagar un poco todo el gel y los pocillos con agua destilada.
- Colocar el gel en la cubeta de electroforesis con cuidado de poner los polos en el sentido correcto. Rellenarla con *Running Buffer* hasta la cantidad indicada en función del número de geles que tengamos.
- Cargar el gel:
 - a. Pocillo 1: marcador de peso molecular (Kaleidoscope Prestained Standards, Catalog 161-0324, Control 310009463; BioRad); 2 – 2,5 µL. (no añadirle tampón de carga).
 - b. Restantes pocillos: muestras; 20µL. (con su correspondiente tampón de carga). Descargarlas despacio de la pipeta para que no queden muy arriba en los pocillos.

- Comenzar a correr el gel:
 - a. Correr a 80 V hasta que todas las muestras se asienten en sus pocillos, entren bien al *Stacking Gel*, formen el frente y lleguen al *Running Gel* (~15').
 - b. Correr a 150 V, 60 minutos aproximadamente. Si se baja el voltaje aumenta el tiempo de electroforesis (a 100 V podemos hacer otra cosa); ésta se acaba cuando el frente llega al final del gel sin salirse (línea verde del soporte de plástico más o menos).

5. Transferencia:

- Activar las membranas PVDF sumergiéndolas 10 minutos en metanol absoluto. Pasarlas posteriormente a tampón de transferencia.
- Sumergir en tampón de transferencia los componentes que intervienen en la misma (esponjas y filtros; membrana tras su activación).
- Sacar el gel tanto del soporte de electroforesis (enjuagarlo con H₂O_d) como de los cristales; desechar el *Stacking Gel*. Montar el sándwich de transferencia:
 - a. (-) Parte negra del soporte – Esponja – 2 Filtros – Gel – Membrana – 2 Filtros – Esponja – Parte blanca del soporte (+).
 - b. Evitar la formación de burbujas entre los elementos del sándwich (pasar un tubito en cada una de las capas que se monte).
 - c. Colocar el frente del gel en la parte de abajo del soporte (es la que da al pliegue).

- d. Echar continuamente tampón entre los elementos del sándwich para que no se seque y para que se deslicen mejor unos sobre otros.
- e. Meter en la cubeta junto con un bloque de hielo (la transferencia se da a 4 °C); rellenarla con tampón de transferencia hasta donde indica la marca.
- f. Poner a correr a 80 V, 60 minutos.

6. Saturación o bloqueo:

- Enjuagar la membrana en PBS 1X para eliminar restos del tampón de transferencia (se pone en el agitador a unos 240 de velocidad mientras recogemos todo lo demás).
- Incubar la membrana con tampón de bloqueo (una de las dos opciones):
 - a. 30 minutos; temperatura ambiente; en agitación.
 - b. Toda la noche; 4 °C; en agitación.

7. Revelado:

- Lavar 3 veces durante 5 minutos con tampón de lavado.
- Incubar con anticuerpo primario (dilución 1:2.000): 60 minutos, temperatura ambiente, agitación (el anticuerpo 1º Sí se reutiliza, por lo que se puede guardar congelado a -20 °C para posteriores utilizaciones). 5µL. anticuerpo 1º para 10 mL. de volumen final; usar tampón diluidor de anticuerpos.
- Lavar 3 veces durante 5 minutos con tampón de lavado.

- Incubar con anticuerpo secundario (1:20.000): 30 minutos, temperatura ambiente, agitación (el 2º NO se reutiliza). 1µL. anticuerpo 2º para 20 mL. de volumen final; usar tampón diluidor de anticuerpos.
 - Lavar 3 veces durante 5 minutos con tampón de lavado.
 - Revelado con el kit de quimioluminiscencia (Immun-Star™ WesternC™ Kit; Catalog: ref 170-5070; BioRad): adición de 1mL. de cada reactivo (luminol y peroxidasa) a un tubo Falcon; una vez mezclados se vierten sobre la membrana durante unos minutos (pasando el líquido de revelado continuamente sobre ésta). Introducir la membrana en el documentador de geles (Universal Hood II; BioRad).
8. Tinción del gel (si se desea comprobar que se ha realizado la completa transferencia de las proteínas a la membrana; en tal caso, el gel debe aparecer limpio):
- Limpiar el gel con un poco con H₂O_d.
 - Añadir la mezcla de azul de bromofenol (Brilliant Blue R; referencia: B0149-250; Sigma) junto con colorante para desteñir.
 - Incubar toda la noche; temperatura ambiente (a las 3 horas aproximadamente comienza a verse algo).
 - Enjuagar un poco el gel con H₂O_d.
9. Tinción de la membrana (si se desea comprobar que realmente se ha dado la transferencia de las proteínas a ésta):
- Lavado de la membrana con PBS.
 - Enjuagado con H₂O_d.
 - Tinción con rojo Ponceau (AppliChem; referencia: A2935.0500) hasta que se aprecien las bandas proteicas en la membrana.

- Enjuagado con H₂O_d.
- Secado de la membrana (dejar que se seque sobre una superficie con papel de filtro).

AISLAMIENTO Y EXPANSIÓN CELULAR:

El aislamiento y expansión de las células humanas derivadas de la fracción del estroma vascular del TA humano de timo y subcutáneo fue llevado a cabo según el procedimiento de Zuck y col. (2001) modificado.

El protocolo utilizado fue el siguiente:

1. Las muestras de tejido adiposo fueron recogidas de los pacientes sometidos a injerto de bypass arterio-coronario y transportadas en medio salino (Hank's balanced Salt Solution 10X, Sigma, H9269) suplementado con penicilina y estreptomina al 3% (Sigma; P0781) y anfotericina al 1% (Sigma; A-2942).
2. Las biopsias de tejido adiposo fueron lavadas con PBS (Phosphate buffered saline tablet; Referencia: P4417; Sigma) para eliminar los restos celulares y, bajo condiciones de esterilidad, diseccionadas en pequeñas piezas con la ayuda de un bisturí para posteriormente ser sometidas a digestión enzimática con una solución de medio Hank's con colagenasa tipo I (Collagenase from *Clostridium Histolyticum* Type I; Referencia C2674-1G; Sigma) al 0.150% y suero de albúmina bovino (Bovine Serum Albumin; Referencia A3294-50g; Sigma) al 1.0%. Es conveniente no tener almacenada esta solución de digestión, por lo que se recomienda prepararla momentos antes de su

utilización. La digestión se realizó durante una hora a 37 °C en un baño con agitación.

3. La suspensión tisular obtenida de la digestión enzimática fue centrifugada a 500 xg durante 10 min y los adipocitos flotantes fueron separados de la fracción vascular estromal precipitada por decantación.
4. La fracción del estroma vascular fue filtrada a través de una malla de Nylon de 100- μ m (Falcon Brand Plasticware; Referencia: 352360; BD Biosciences) dentro de la campana para eliminar los posibles grumos que quedasen y depositada en un nuevo tubo Falcon limpio. Posteriormente se centrifugó a 300 xg durante 5 min.
5. El pellet celular fue re-suspendido en buffer de lisis de eritrocitos (Red Blood Cell Lysing Buffer Hybri-MaxTM; Sigma; R7757) durante 10 min a temperatura ambiente y nuevamente centrifugado a 300 xg durante 5 min
6. El pellet celular resultante fue resuspendido en medio DMEM/F12 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient Mixture F-12 Ham; Sigma; D6421) suplementado con suero fetal bovino (Fetal Bovine Serum; Gibco; 10270-106) al 10%, 100 μ g/mL de penicilina/estreptomicina (Sigma; P0781), 2mM de L-glutamina (Sigma; G7513) y 1 μ g/mL de anfotericina B (Sigma; A2942).
7. Las células fueron puestas en frascos de cultivo tisular e incubadas en atmósfera húmeda con un 5% de CO₂ a 37 °C hasta

que alcanzaron un 90% de confluencia (aproximadamente 7 días).

CITOMETRÍA DE FLUJO:

Las células de la fracción vascular estromal de los tejidos adiposos (en pase 0 y pase 3) fueron caracterizadas inmunofenotípicamente mediante citometría de flujo de acuerdo a sus marcadores celulares de superficie, entre los que se incluyeron Thy1/CD90 (anti-human CD90 -Thy-1- APC; 17-0909, eBioscience), CD29 (anti-human CD29 -integrin beta 1- FITC; 11-0299, eBioscience) y CD49a (ITGA/CD49a/Integrin Alpha 1 Mouse anti-Human Monoclonal -FITC- Antibody; LS-C15953-100, LifeSpan BioSciences).

El protocolo utilizado fue el siguiente:

1. Tras obtener el 90% de confluencia de las células adherentes, se realizó la caracterización inmunofenotípica de las células de la SVF. Las células fibroblastoides fueron en primer lugar tripsinizadas. Para ello se añaden 500 μ L de PBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline; Sigma; D8537) por pocillo. Se aspira este primer lavado y se añaden 300 μ L/pocillo de tripsina (Trypsin-EDTA Solution; Sigma; T3924), dejándola actuar durante 5 minutos a 37°C. Tras este tiempo, se añaden 300 μ L/pocillo de medio DMEM/F12 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient Mixture F-12 Ham; Sigma; D6421) suplementado con suero fetal bovino (Fetal Bovine Serum; Gibco; 10270-106) al 10%, 100 μ g/mL de penicilina/estreptomina (Sigma; P0781) y 2mM de L-glutamina (Sigma; G7513) para bloquear la acción de la tripsina.

Esta solución que contiene las células gracias a que mediante la acción de la tripsina se ha conseguido que se despeguen de la superficie de la placa, se recoge y se deposita en un tubo Falcon limpio y el pocillo se vuelve a lavar con PBS para recoger el resto de células que hayan podido quedar en la placa. Se centrifuga la solución celular durante 5 minutos a 400 g para formar un pellet, el cual se resuspende en 100 μ L de medio de cultivo para poder proceder al conteo celular mediante uso de un hematómetro o cámara de Neubauer.

Nota: Conteo en cámara de Neubauer. Se toman 10 μ L de la mezcla preparada y se cargan de manera uniforme en uno de los laterales del hemocitómetro. A continuación se coloca la cámara en la bandeja del microscopio y se enfoca hasta que se vean nítidas las células al mirar por el binocular. Se busca el primer cuadro donde vaya a realizarse el recuento. Existe una convención por la cual si las células tocan el límite superior o el límite izquierdo del cuadro, deben contabilizarse, pero no se contabilizan si tocan el límite inferior o el límite derecho. En caso de que la concentración celular sea muy alta, y sea fácil perderse en el recuento, se suele utilizar un orden de conteo en forma de zigzag.

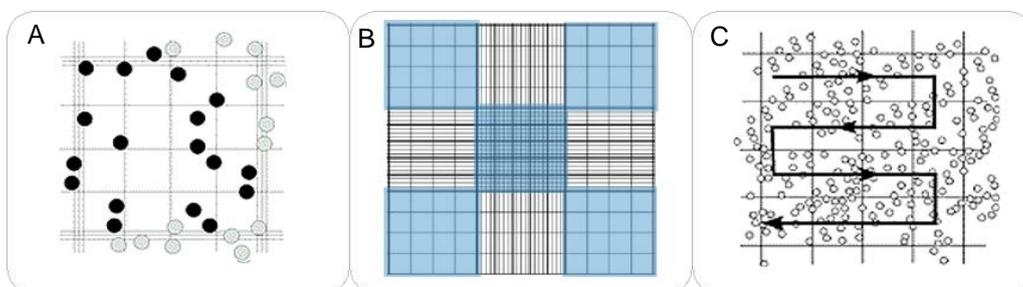


Figura superior. Detalles del hemocitómetro o Cámara de Neubauer. A. Conteo de un cuadro grande en cámara de Neubauer. B. Recuento de 5 cuadros grandes (marcados en azul) en cámara de Neubauer. C. Recuento celular típico en zigzag para casos de alta concentración celular.

En una hoja se van anotando los resultados de células contadas y se repite el proceso para todos aquellos cuadros que se deseen contar, anotando el resultado de cada uno de ellos. Cuantos más cuadros contemos, más precisión obtendremos en nuestra medida. Finalmente aplicamos la fórmula del cálculo de concentración celular, teniendo en cuenta de que si hemos aplicado alguna dilución, deberemos considerarla.

$$\text{Concentración (células/mL)} = \frac{\text{Número de células} \times 10000}{\text{Número de cuadrados} \times \text{dilución}}$$

2. Las células fueron alicuotadas (1×10^5) en tubos de polipropileno y, de acuerdo con las instrucciones del fabricante, se añadió 10 ó 20 μL de solución de anticuerpo de ratón contra los respectivos marcadores de superficie celular unidos a su correspondiente fluorocromo. Uno de los tubos se destinó a realizar los pertinentes controles de isotipo.
3. Todos los tubos fueron incubados en hielo y protegidos de la luz durante 30 min.
4. Posteriormente las células se lavaron dos veces en una solución tampón bloqueante (PBS -Dulbecco's Phosphate Buffered Saline; Sigma; D8537- suplementado con BSA -Bovine Serum Albumin; Sigma; A3294- al 3%; en cada lavado se hace una centrifugación de 5 minutos a 300 g).
5. Finalmente fueron resuspendidas en 1 mL de PBS (Sigma; D8537) para realizar la lectura del Inmunofenotipo en el citómetro

de flujo: adquisición de 1×10^4 eventos por tubo a través de un analizador CyAn™ cytometer ADP high-speed analyzer (Beckman Coulter).

6. La adquisición de datos y su análisis fue realizado utilizando el programa informático SUMMIT.3 software (Beckman Coulter). Las células no teñidas fueron utilizadas para establecer la configuración de los parámetros del citómetro de flujo.

ENSAYO *IN VIVO* EN MEMBRANA CORIOALANTOIDEA DE CODORNIZ (CHRIOALLANTOIC MEMBRANE - CAM):

Para llevar a cabo este ensayo se toman huevos de codorniz fertilizados y se incuban horizontalmente a 37.5 °C en un incubador humidificado. Al tercer día de la incubación se extraen 0.5 mL de albúmina para crear una falsa cámara de aire. Sobre dicha cámara de aire se realiza una ventana en la superficie del huevo, la cual se sella con cinta adhesiva. Al noveno día de incubación se elimina el sellado de la cámara, dejando la ventana al descubierto y a través de ella se coloca un fragmento de unos 2x2 mm de los distintos tipos de grasa a medir, en este caso TAT y TAS, sobre la membrana corioalantoidea (CAM). Los controles negativos consistieron en huevos de codorniz tratados del mismo modo indicado pero sin inserción de ningún tipo de fragmento de grasa sobre la CAM. Se vuelve a sellar la apertura y se realiza una nueva incubación del huevo durante 48 horas. Transcurrido este tiempo se disecciona la membrana junto con el fragmento de grasa y se fija en paraformaldehído al 4% (Formaldehyde 4%; Prolabo; 9713.9025) durante 5 horas a temperatura ambiente. Las secciones se incluyen posteriormente en

parafina (Merck; 1.11609.2500) y una vez desparafinadas, se bloquean con suero de cabra (sheep serum; Sigma; S3772-10ML) al 16% en PBS (Sigma; 8537). Para finalizar se incuban durante toda la noche con el anticuerpo monoclonal de ratón QH1 (DSHB) a dilución 1:100, el cual reconoce de manera específica determinantes de superficie de células del linaje hemangioblástico de codorniz. Tras un lavado, se incuban con antimouse-FITC y DAPI. El examen de la CAM se realiza bajo microscopio confocal; el ensayo se puntúa como positivo cuando dos observadores independientes informan sobre aumento/reducción significativa de los vasos del área tratada.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO:

Los resultados se expresaron como la media \pm error estándar medio (SEM). Todos los parámetros clínicos están resumidos por parámetros estadísticos. Las relaciones entre ambos grupos (sujetos de mediana y tercera edad) fueron analizados usando un test U de Mann-Whitney. Los análisis de correlación fueron realizados con un test de correlación de Spearman's (r). Las correlaciones parciales para controlar los factores de confusión (IMC, glucosa, triglicéridos y colesterol) también fueron realizadas. En todos los casos, el niveles de rechazo para la hipótesis nula fue $\alpha=0.05$ para ambos extremos/colas. El análisis estadístico fue llevado a cabo con el programa SPSS (Versión 15.0 para Windows; SPSS, Chicago, IL).

Estudio 2: Caracterización de células mesenquimales procedentes de TAT y TAS en relación con el incremento de la edad

PACIENTES Y RECOGIDA DE TEJIDO ADIPOSO:

El estudio reclutó pacientes que recibieron injerto de bypass artero-coronario (CABG) con bypass cardio-pulmonar (CBP) en el Hospital Regional Universitario Carlos Haya de Málaga. La media del número de injertos usados fue de 3,1 por paciente. Los sujetos operados y reclutados en este estudio fueron individuos con situación estable y sin lesión isquémica severa. Por tanto, estos sujetos no habían sufrido infarto durante su vida o, al menos, no lo habían sufrido 6 meses antes de la cirugía.

Para el ensayo de proliferación celular (curvas de crecimiento celular), el ensayo de formación de colonias fibroblásticas y el estudio de citometría, el número total de pacientes con similares características clinicopatológicas fue de N=5 (todos ellos con edad superior a 70 años).

Para realizar las diferenciaciones celulares y el posterior análisis de la expresión de ARNm se realizaron dos grupos de pacientes:

- Grupo de mediana edad: desde 45 años hasta 65 años.
- Grupo de tercera edad: 70 años aproximadamente.

El número total de pacientes reclutados para este estudio fue:

- Diferenciación Adipogénica y Diferenciación Osteogénica: N=26.
(Grupo de mediana edad: N=8. Grupo de tercera edad: N=18).
- Diferenciación Endotelial: N=13. (Grupo de mediana edad: N=5.
Grupo de tercera edad: N=8).

Para la formación de túbulos por células endoteliales procedentes de la vena safena humana (HSaVEC) en medio condicionado generado por cultivo de células procedentes de la SVF derivadas de TAT y TAS se realizaron los dos mismos grupos de pacientes (mediana y tercera edad; N=20), estando cada grupo constituido por:

- Grupo de mediana edad: N=12.
- Grupo de tercera edad: N=8.

Este estudio fue aprobado por el comité ético local del Hospital Regional Universitario Carlos Haya, y todos los pacientes participantes firmaron el pertinente consentimiento informado (adjunto al final de este apartado) elaborado por la Sociedad Española de Cirugía Torácica y Cardiovascular (SECTCV).

Ambos tejidos adiposos, tanto el subcutáneo como el de timo, fueron obtenidos al inicio del procedimiento quirúrgico y antes del paro del corazón. El sitio de recogida de la grasa subcutánea fue la propia incisión del pecho. Para la realización del ensayo de proliferación celular (curvas de crecimiento celular), el ensayo de formación de colonias fibroblásticas, el estudio de citometría de flujo y las diferenciaciones celulares se procesó el tejido en fresco tras su traslado a laboratorio en medio salino suplementado (Hank's balanced Salt Solution -Sigma; H9269- enriquecida con penicilina/estreptomicina al 3% -Sigma; P0781- y anfotericina al 1% -Sigma; A-2942-).

AISLAMIENTO Y EXPANSIÓN CELULAR:

El aislamiento y expansión de las células mesenquimales derivadas de la fracción del estroma vascular del TA humano de timo y subcutáneo fue llevado a cabo según el procedimiento de Zuck y col. (2001) modificado, anteriormente descrito en el apartado de materiales y métodos correspondientes al estudio 1.

ENSAYO DE PROLIFERACIÓN CELULAR (CURVAS DE CRECIMIENTO CELULAR):

Análisis de la cinética de proliferación celular de las células de la fracción vascular estromal del TAT y TAS. Las células de ambos tejidos adiposos cultivadas en pase tres fueron sembradas por triplicado en placas de 12 pocillos en medio de expansión DMEM/F12 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient Mixture F-12 Ham; Sigma; D6421) suplementado con suero fetal bovino (Fetal Bovine Serum; Gibco; 10270-106) al 10%, 100 µg/mL de penicilina/estreptomicina (Sigma; P0781) y 2mM de L-glutamina (Sigma; G7513) a una densidad celular de 5000 células por cm². Las células fueron separadas de la placa con tripsina (Trypsin-EDTA Solution; Sigma; T3924; procedimiento explicado anteriormente) y contadas cada 48 horas durante 23 días de acuerdo con el método de exclusión de células viables de las no viables del colorante azul trypano (Trypan Blue Solution; Sigma; T8154). Con esta técnica se toman 100 µl de la suspensión celular, se añade igual volumen del azul de tripano (factor de dilución de 2) y se mezclan bien mediante pipeteo suave. Se toma el hemocitómetro o cámara de Neubauer, se limpia y se humedece un poco el cubreobjetos mediante aire exhalado para

posteriormente deslizarlo sobre la cámara de un lado a otro utilizando una ligera presión hasta que los anillos de refracción de Newton aparecen (son unos anillos tipo arco iris que aparecen bajo el cubreobjetos). Se llenan ambos lados de la cámara con unos 10 μl de la suspensión celular con colorante y se visualiza en un microscopio invertido de contraste de fases usando aumentos de 20X. Ya se puede proceder al conteo celular: células viables, que aparecen como células brillantes, y células no viables, que son las teñidas de azul. Lo ideal es contar más de 100 células, y para ello es necesario recordar el número de cuadrados de la cámara utilizados para alcanzar dicha cantidad.

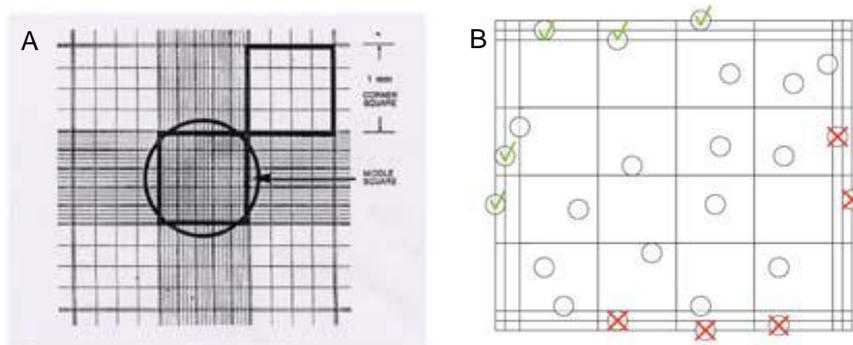


Figura superior. Hemocitómetro o Cámara de Neubauer. A. Detalle de las rejillas del hemocitómetro o cámara de Neubauer. B. Para el conteo celular se incluyen las células que están tanto en el medio de cada cuadrado como en los bordes superior y lateral izquierdo (marcadas con v-check en verde), mientras que se excluyen las solapadas con los bordes inferior y lateral derecho (marcadas con cruz roja).

Para calcular la concentración de células viables y no viables así como el porcentaje de células viables se utilizan las siguientes ecuaciones:

$$\text{Recuento de células viables (células viables/mL)} = \frac{\text{N}^{\circ} \text{ de células vivas contadas}}{\text{N}^{\circ} \text{ de cuadrados contados}} \times \text{Dilución} \times 10000$$

$$\text{Recuento de células no viables (células muertas/mL)} = \frac{\text{N}^{\circ} \text{ de células muertas contadas}}{\text{N}^{\circ} \text{ de cuadrados contados}} \times \text{Dilución} \times 10000$$

$$\text{Porcentaje de viabilidad} = \frac{\text{N}^{\circ} \text{ de células viables}}{\text{N}^{\circ} \text{ de células totales}} \times 100$$

Posteriormente, el doblaje poblacional (PDs) fue calculado usando la siguiente ecuación:

$$\text{PDs} = 240 / \log_2 (N_2 / N_1)$$

Donde N_2 y N_1 representan el número medio de células en los días 15 y 5 respectivamente.

ENSAYO DE UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS

FIBROBLASTOIDES (CFU-F assay):

Las células de la fracción vascular estromal fueron sembradas por triplicado en placas de 6 pocillos en medio de expansión (DMEM/F12 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient Mixture F-12 Ham; Sigma; D6421) suplementado con suero fetal bovino (Fetal Bovine Serum; Gibco; 10270-106) al 10%, 100 µg/mL de penicilina/estreptomicina (Sigma; P0781) y 2mM de L-glutamina (Sigma; G7513) a una densidad celular de 50 células por

cm². Los cultivos se mantuvieron durante 14 días bajo condiciones estándar de cultivo celular (37°C, 5% CO₂, atmósfera húmeda). El día 14 se eliminó el medio y las colonias resultantes se lavaron dos veces con PBS (adición de 1 mL de PBS -Sigma; D8537- y aspirado), se fijaron con metanol absoluto y fueron teñidas con cristal violeta al 0.5% (Panreac; 131762) durante 20 minutos a temperatura ambiente. Las placas fueron lavadas con agua destilada y las colonias de más de 50 células fueron contadas bajo microscopio.

CITOMETRÍA DE FLUJO:

Las células de la fracción vascular estromal de los tejidos adiposos (en pase 0 y pase 3) fueron caracterizadas inmunofenotípicamente mediante citometría de flujo de acuerdo a sus marcadores celulares de superficie, entre los que se incluyeron CD14 (BD Pharmingen; 555397), CD19 (BD Pharmingen; 557835), CD34 (BD eBioscience; 11-0349-42), CD45 (BD Pharmingen; 557748), CD73 (BD Pharmingen; 550257), HLA-DR (Miltenyi; 130-095-297), CD29 (eBioscience; 11-0299-41), CD31 (eBioscience; 17-0319-71), CD44 (Miltenyi; 130-095-195), CD49D (eBioscience; 12-0499-71), CD90 (eBioscience; 11-0909-71), CD105 (Miltenyi; 130-094-926), CD106 (eBioscience; 12-1069-71), CD133 (eBioscience; 12-1338-41), CD144 (eBioscience; 17-1449-73), CD146 (eBioscience; 11-1469-41), CD184 (BD Pharmingen; 560669), CD140A (RD Systems; FAB1264A), CD140B (RD Systems; FAB1263P), CD166 (RD Systems; FAB6561P). El protocolo utilizado fue el mismo que el descrito en el apartado de materiales y métodos correspondientes al estudio 1.

ENSAYOS DE DIFERENCIACIÓN: DIFERENCIACIÓN ADIPOGÉNICA, DIFERENCIACIÓN OSTEOGÉNICA Y DIFERENCIACIÓN ENDOTELIAL:

Las células procedentes de la fracción del estroma vascular de ambos tejidos adiposos fueron analizadas según su potencial para diferenciar hacia adipocitos, hueso y células endoteliales. Las células fueron inducidas a diferenciación entre los pases 2-3. Las células de ambos tejidos fueron sembradas en medio de expansión en placas de 6 pocillos a una densidad de 10000 células por cm^2 hasta que alcanzaron un 90% de confluencia. El medio de expansión fue cambiado cada 2-3 días y reemplazado con medio adipogénico y osteogénico el día número 14, y con medio endotelial en el día 9. Como control negativo se utilizaron células de la SVF cultivadas sin suplementos de diferenciación (medio de expansión: DMEM/F12 -Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient Mixture F-12 Ham; Sigma; D6421- suplementado con suero fetal bovino -Fetal Bovine Serum; Gibco; 10270-106- al 10%, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de penicilina/estreptomicina -Sigma; P0781- y 2mM de L- glutamina -Sigma; G7513-).

El medio de inducción adipogénico fue DMEM/F12 (Sigma; D6421) suplementado con FBS 0,1 mL/mL (Gibco; 10270-106), penicilina/estreptomicina 100 U/mL (Sigma; P0781), L-glutamina 2 mM (Sigma; G7513), insulina 10 μM (Sigma; I9278), 3-Isobutil-1-metilxantina 0,5 mM (Sigma; I5879), dexametasona 1,0 μM (Sigma; D8893), Pioglitazona 10 μM (Sigma; E6910), Rosiglitazona 0,5 μM (Sigma; R2408), Biotina 33 μM (Sigma; B4501) y Pathenonato de Calcio 17 μM (Sigma; P5155). Tras 72 horas de la inducción adipogénica, el medio fue reemplazado por otro de mantenimiento adipogénico que consistió en medio DMEM/F12 (Sigma; D6421) suplementado con FBS 0,1

mL/mL (Gibco; 10270-106), penicilina/estreptomicina 100 U/mL (Sigma; P0781), L-glutamina 2 mM (Sigma; G7513), insulina 10 μ M (Sigma; I9278), dexametasona 1,0 μ M (Sigma; D8893), Pioglitazona 10 μ M (Sigma; E6910) y Rosiglitazona 0,5 μ M (Sigma; R2408). La evaluación cualitativa del estado adipogénico fue confirmada tras 14 días mediante tinción de vacuolas lipídicas citoplasmáticas con una solución de Oil Red O al 30% (Alfa Aesar; A12989). Para ello en primer lugar se lavaron los pocillos dos/tres veces con 500 μ L de PBS por pocillo; posteriormente las células se fijaron durante 20 minutos a temperatura ambiente con 500 μ L de formalina neutra tamponada (Sigma; HT5011-1C) al 10%. A continuación se realizó nuevamente un lavado de cada pocillo con 500 μ L de PBS y por último se adicionaron 500 μ L de la solución de Oil Red O al 30 % previamente filtrada a través de filtros de 0,45 y 0,20 μ m (Corning; 431225 y 431224); ésta se dejó actuar sobre las células durante 60 minutos a temperatura ambiente y tras ese tiempo se retiró el colorante mediante cuidadosos lavados con agua desionizada (2/3 lavados, hasta aclarar el pocillo). La observación en microscopio invertido de vacuolas lipídicas intracelulares teñidas de rojo fue considerada una reacción positiva a la coloración con el Oil Red O (Ramírez-Zacarías JL. y col.; 1992). La evaluación cuantitativa se confirmó por la expresión de genes específicos de adipocitos (Leptina, LPL, PPAR γ) usando la Reacción en Cadena de la Polimerasa a Tiempo Real (qRT-PCR).

La diferenciación osteogénica fue realizada con medio DMEM/F12 (Sigma; D6421) que contenía FBS 0,1 mL/mL (Gibco; 10270-106), penicilina/estreptomicina 100 U/mL (Sigma; P0781), L-glutamina 2 mM (Sigma; G7513), dexametasona 1,0 μ M (Sigma; D8893), Ácido ascórbico 200 μ M;

(Sigma; A8960) y β -glicerolfosfato 20 mM (Sigma; 9422). La evaluación cualitativa del potencial osteogénico fue realizada por tinción de deposiciones de fosfato de calcio (mineralización del cultivo) con una solución de Alizarin red al 2,0% con pH 4.1-4.3 (Sigma; A5533). Para ello en primer lugar se lavaron los pocillos dos/tres veces con 500 μ L de PBS por pocillo; posteriormente las células se fijaron durante 20 minutos a temperatura ambiente con 500 μ L de formalina neutra tamponada (Sigma; HT5011-1C) al 10%. A continuación se realizó nuevamente un lavado de cada pocillo con 500 μ L de agua desionizada y por último se adicionaron 500 μ L de la solución de Alizarín Red al 2,0 % con pH 4.1-4.3 (gracias al uso de hidróxido de amonio) previamente filtrada a través de filtros de 0,45 y 0,20 μ m (Corning; 431225 y 431224); ésta se dejó actuar sobre las células durante 45 minutos a temperatura ambiente y tras ese tiempo se retiró el colorante mediante cuidadosos lavados con agua desionizada (2/3 lavados, hasta aclarar el pocillo). La observación en microscopio invertido un precipitado rojo cristalino fue indicativo de una reacción positiva (Lievremont M. y col.; 1982). El estado osteogénico se evaluó de manera cuantitativa midiendo el nivel de expresión de genes específicos del linaje osteogénico como son fosfatasa alcalina, osteonectina, osteopontina y osteocalcina mediante qRT-PCR.

El medio endotelial consistió en medio de crecimiento celular endotelial MV2 (Endothelial Cell Growth Medium MV2; PromoCell; C22121) el cual está suplementado con FCS 0,05 mL/mL, Factor de crecimiento epidérmico (EGF) 5 ng/mL, factor de crecimiento fibroblástico (FGF-2) 10 ng/mL, factor de crecimiento relativo a la insulina (Long R3 IGF) 20 ng/mL, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF 165) 0,5 ng/mL), ácido ascórbico 1 μ g/mL) e

hidrocortisona 0,2 µg/mL. Tras 8 días de cultivo se evaluó de manera cualitativa el estado de diferenciación endotelial mediante inmunomarcaje de CD31 (eBioscience; 17-0319-71), CD34 (eBioscience; 11-0349-42) y CD309 (Miltenyi; 130-093-598) y de manera cuantitativa por RT-PCR según el nivel de expresión de genes asociados al linaje endotelial como los que codifican para CD31, CD34, CD309 y VWF.

EXTRACCIÓN DE ARN:

El ARN total fue aislado de los cultivos celulares mediante el uso del reactivo RNA Stat-60 (RNA Stat-60; Referencia: Cs-111; Amsbio).

El protocolo utilizado fue el siguiente:

Nota: El reactivo Stat-60 contiene fenol, por lo que todo el trabajo deberá hacerse en la campana extractora. Además se trata de un reactivo fotosensible, por lo que es conveniente protegerlo lo máximo posible de la luz.

1. Coger la correspondiente placa de cultivo del incubador e introducirla en la campana. Recoger parte del medio de cultivo de los pocillos en eppendorfs de 1,5 mL debidamente rotulados (para posibles estudios posteriores de muerte celular) y descartar el resto.
2. Homogenización:
 - a. Añadir 1.7 mL del reactivo Stat-60 a cada pocillo de la placa de cultivo. Este paso es conveniente realizarlo en dos tandas de 850 µL cada una de forma que los pocillos estén secos el menos tiempo posible.

- b. Pipetear varias veces pasando el reactivo por toda la superficie del pocillo para despegar la totalidad de células que hay pegadas en la placa.
- c. Transferir la mezcla “células/Stat-60” a eppendorfs de 2 mL limpios debidamente rotulados y mantenerlos en frío.

3. Extracción:

- a. Vortear brevemente los eppendorfs y almacenarlos 10 minutos a 4°C (para permitir la completa rotura celular y la disociación de los complejos nucleoprotéicos).
- b. Añadir 200 μ L de cloroformo por cada mL de Stat-60 usado en la homogenización (en nuestro caso, añadir 340 μ L de cloroformo).
- c. Vortear la muestra con fuerza durante 15 segundos e incubar 2-3 minutos a temperatura ambiente.
- d. Centrifugar 15 minutos a 12.000 xg y 4°C. Durante este tiempo se ponen en hielo los tubos que necesitaremos para el siguiente paso.
- e. Transferir el sobrenadante acuoso claro resultante de la centrifugación (unos 600 μ L por cada mL de Stat-60 añadido al principio del procedimiento) a un pre-enfriado eppendorfs limpio libre de RNasas.

4. Precipitación:

- a. Precipitar el ARN con 500 μ L de isopropanol (2-propanol) por cada mL de Stat-60 usado en la homogenización (en

nuestro caso, añadir 850 μ L de isopropanol). Mezclar bien por inversión de los tubos.

- b. Dejar precipitando el ARN a temperatura ambiente durante 15 minutos o a -20°C durante mínimo 30 minutos (puede ser extendido a conveniencia, como mucho, toda la noche, pero no es muy recomendable).
- c. Centrifugar 10 minutos a 12.000 xg y 4°C para concentrar el ARN (a menudo el precipitado de ARN es visible antes de la centrifugación) el cual forma un pellet blanco en el fondo del eppendorf.
- d. Tras la centrifugación, desechar el sobrenadante con la pipeta y con cuidado de no arrastrar el pellet blanco que se ha formado.

5. Lavado.

- a. Añadir 1 mL de etanol al 75% por cada mL de Stat-60 usado en la homogenización (en nuestro caso, añadir 1,7 mL de etanol al 75%).
- b. Centrifugar 5 minutos a 12.000 xg y 4°C . Desechar el sobrenadante con la pipeta tras la centrifugación.
- c. Secar al aire los pellets, sin salir de la campana extractora, durante unos 5-10 minutos (se sabe cuándo están ya secos porque se vuelven totalmente transparentes, de ahí que sea conveniente marcar la zona del pellet con un rotulador).

- d. Resuspender el ARN en 30 μ L de agua libre de nucleasas. Introducir los eppendorf rápidamente en hielo. El ARN se guarda a -80 °C tras su cuantificación. Si tras ésta se estima oportuno, realizar purificación en columnas (RNeasy® Lipid Tissue Mini kit (Cat. N° 74804, QUIAGEN, Valencia, CA).

CUANTIFICACIÓN DE ARN:

El ARN total fue cuantificado mediante la utilización del espectrofotómetro ND-1000 (NanoDrop® ND-1000). Las correspondientes concentraciones de ARN fueron determinadas por absorbancia a 260 nm (A260) y su pureza fue estimada mediante los valores del ratio A260:A280 (un ratio de ~2.0 es generalmente aceptado como puro para ARN; un ratio menor puede ser indicativo de la presencia de proteínas, fenoles u otros contaminantes que absorben con fuerza, o cercanos, a los 280 nm) y del ratio A260/230 (este ratio es usado como una medida secundaria de la pureza de los ácidos nucleicos, los valores esperados para éste están dentro del rango 2.0 - 2.2; si este ratio es apreciablemente menor al esperado, esto puede ser indicativo de la presencia de contaminantes que absorben a 230 nm).

El volumen utilizado para la realización de la cuantificación fue de 2 μ L.

RETROTRANSCRIPCIÓN (RT):

La retrotranscripción se realizó ajustando todas las concentraciones de ARN obtenidas a la de menor concentración, la cual se utilizó como referencia. La reverso-transcripción fue realizada en un termociclador (2720 Thermal

Cycler; Applied Biosystems) usando el kit High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit with RNase Inhibitor, 200 reactions de Applied Biosystems (Referencia 4374966). La cantidad de ARN total a usar con este kit es de hasta 2 µg por cada 20 µL de reacción.

El protocolo utilizado fue el siguiente:

1. Preparación de la mezcla de reacción, 2x (para 20 µL de volumen final):
 - a. Dejar que los componentes del kit se descongelen en hielo. Trabajar en frío en todo momento.
 - b. Calcular el volumen de reactivos necesario para llevar a cabo nuestras reacciones en función de la siguiente tabla:

Componente	Volumen por reacción (µL)
10X RT Buffer	2
25X dNTP Mix (100 mM)	0.8
10X RT Random Primers	2.0
MultiScribe™ Reverse Transcriptase	1.0
Rnase Inhibitor	1.0
H ₂ O libre de nucleasas	3.2
Total por reacción	10.0

Nota: No olvidar incluir en los cálculos un par de reacciones adicionales para obtener el exceso de volumen necesario para compensar las pérdidas que se producen de éste tras continuos pipeteos.

- c. Resuspender todos los reactivos para que se mezclen bien y mantener nuestra mezcla de reacción en hielo.
2. Preparación de las reacciones de RT:
- a. Pipetear 10 μL de la mezcla de reacción 2X en los correspondientes eppendorfs de RT debidamente rotulados.
 - b. Pipetear en cada tubo de RT 10 μL de las diluciones de ARN preparadas de nuestras muestras (todas tendrán la misma concentración la cual se corresponde con la concentración que posea la muestra utilizada como referencia).
 - c. Mezclar bien por pipeteo. Tener cuidado de no dejar burbujas en los tubos de reacción y que todo el volumen de la mezcla quede en la parte inferior de éstos. Si es posible, dar un spin de centrifugación para asegurarse de que toda la mezcla de reacción queda en el fondo del tubo.
 - d. Mantener los eppendorfs en hielo hasta su introducción en el termociclador para comenzar la retrotranscripción.
3. Programación del termociclador para llevar a cabo la RT (indicar que el volumen de reacción es 20 μL):

	PASO 1	PASO 2	PASO 3	PASO 4
Temperatura	25 °C	37 °C	85 °C	4 °C
Tiempo	10 min	120 min	50 min	Mantenimiento

CUANTIFICACIÓN DE ADNc:

El volumen final que se obtiene de ADNc tras la retrotranscripción es de 20 μ L, siendo en todos los casos la concentración de ADNc resultante la mitad de la concentración de ARN de la muestra utilizada como referencia (X ng/ μ L). La pureza de ADNc fue estimada mediante la utilización del espectrofotómetro ND-1000 (NanoDrop® ND-1000) gracias a los valores del ratio A260:A280 (un ratio de ~1.8 es generalmente aceptado como puro para ADN; un ratio menor puede ser indicativo de la presencia de proteínas, fenoles u otros contaminantes que absorben con fuerza, o cercanos, a los 280 nm) y del ratio A260/230 (este ratio es usado como una medida secundaria de la pureza de los ácidos nucleicos, los valores esperados para éste están dentro del rango 2.0 - 2.2; si este ratio es apreciablemente menor al esperado, esto puede ser indicativo de la presencia de contaminantes que absorben a 230 nm).

El volumen utilizado para la realización de la cuantificación fue de 2 μ L.

REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA A TIEMPO REAL (RT-PCR):

Las amplificaciones para los estudios de comparación de los niveles de expresión génica entre los diferentes sujetos de estudio se realizaron utilizando placas de reacción de 96 pocillos (MicroAmp® Optical 96-well reaction plate;

PE Applied Biosystems) en un equipo de PCR a tiempo real tipo 7500 Fast (ABI 7500 Fast Real-Time PCR System; Applied Biosystems).

Las reacciones de PCR cuantitativas se llevaron a cabo para todos los genes usando un volumen final de 25 μ l consistentes en: 11.25 μ l del ADNc cuantificado diluido (éstos 11.25 μ l deben contener 12.5 ng de ADNc para que así la concentración final de éste sea de 0.5 ng/ μ l -lo recomendado por la casa comercial-) y 13.75 μ l de mezcla de reacción (compuesta por 12.5 μ l de Universal PCR Master Mix - 4364341; Applied Biosystems - y 1.25 μ l de la correspondiente sonda de expresión génica específica -TaqMan® Gene Expression Assays; Applied Biosystems-).

Sondas utilizadas:

- SREBP1: Hs00967385_g1
- PPAR γ : Hs01115510_m1
- FABP-4: Hs01086177_m1
- LPL: Hs00173425_m1
- FASN: Hs00188012_m1
- ADRP: Hs00765634_m1
- CEBP α : Hs00269972_s1
- ALPL: Hs01029144_m1
- SPARC: Hs00234160_m1
- SPP1: Hs00959010_m1
- VWF: Hs01109446_m1
- CD34: Hs00990732_m1
- CD31: Hs00169777_m1
- CD309/KDR: Hs00911700_m1

Todas las medidas se realizaron por duplicado. Durante los ciclos de amplificación el valor Ct para cada producto de amplificación fue determinado usando un valor umbral de 0.1. Las señales específicas fueron normalizadas según la expresión constitutiva del gen de la ciclofilina (Cyc: 4326316E) o de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GADPH: 4326317E), usando la fórmula $2^{-\Delta Ct}$.

El protocolo utilizado fue el mismo que el descrito en el apartado de materiales y métodos correspondientes al estudio 1.

**FORMACIÓN DE TÚBULOS POR CÉLULAS ENDOTELIALES
PROCEDENTES DE LA VENA SAFENA HUMANA (HSaVEC) EN MEDIO
CONDICIONADO GENERADO POR CULTIVO DE CÉLULAS
PROCEDENTES DE LA SVF DERIVADAS DE TAT Y TAS:**

A. Obtención del medio de cultivo condicionado. Células procedentes de la SVF del TAT y TAS en pase dos/tres fueron resuspendidas en medio de expansión (DMEM/F12 -Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient Mixture F-12 Ham; Sigma; D6421- suplementado con suero fetal bovino -Fetal Bovine Serum; Gibco; 10270-106- al 10%, 100 µg/mL de penicilina/estreptomicina - Sigma; P0781 y 2mM de L-glutamina -Sigma; G7513-) y sembradas en placas de 6 pocillos a una densidad de 15×10^3 células/cm². Se mantuvieron en condiciones estándar de cultivo (37°C, 5% CO₂, atmósfera húmeda) durante 7/10 días. Posteriormente se sustituyó el medio por Medio Basal de Células Endoteliales (Endothelial Cell Basal Medium MV; PromoCell; C-22220) suplementado con FCS al 5% (PromoCell; C-37350) y se incubó durante 72

horas bajo condiciones de hipoxia (1% de O₂). Transcurrido el tiempo se recolectó el medio condicionado procedente del cultivo de las respectivas células y se centrifugó a 300 xg durante 5 minutos para posteriormente alícuotar el sobrenadante en alícuotas de 450 µL a -80°C hasta su uso.

B. Formación de túbulos. Placas de 96 pocillos mantenidas a 4°C fueron recubiertas con 25 µL de matrigel reducido en factores de crecimiento (Growth Factor Reduced Matrigel; BD; 356231) e incubadas durante 30 minutos a 37°C. Tras este tiempo, se añadieron a cada pocillo 90 µL del medio de cultivo previamente generado y 25x10³ HSaVEC (PromoCell; C-12231) resuspendidas en 10 µL de Medio Basal de Células Endoteliales (Endothelial Cell Basal Medium MV; PromoCell; C-22220). Las células se incubaron bajo condiciones estándar de cultivo (37°C, 5% CO₂, atmósfera húmeda) durante 24 horas. Una vez transcurridas, se procedió a examinar los túbulos endoteliales usando microscopio fluorescente de contraste de fases (Nikon, Japón) con objetivo 4X, seleccionando aleatoriamente, y fotografiando, cuatro campos por duplicado para cada condición experimental probada. Posteriormente se cuantificaron las estructuras tubulares con ayuda del procesador de imágenes NIS Elements Nikon, considerando como túbulos aquellas estructuras cuya longitud superara cuatro veces el ancho.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO:

Los resultados se expresaron como la media ± error estándar medio (SEM). Todos los parámetros clínicos están resumidos por parámetros estadísticos. Las relaciones entre ambos tipos de tejidos (TAT y TAS) y ambos

grupos de pacientes (sujetos mediana y tercera edad) fueron analizados usando un test U de Mann-Whitney. La relación entre los pocillos control y los sometidos a diferenciación adipogénica y osteogénica se analizó mediante una prueba de rangos con signo de Wilcoxon. Los análisis de correlación fueron realizados con un test de correlación de Spearman's (r). En todos los casos, el niveles de rechazo para la hipótesis nula fue $\alpha=0.05$ para ambos extremos/colas. El análisis estadístico fue llevado a cabo con el programa SPSS (Versión 15.0 para Windows; SPSS, Chicago, IL).

CONSENTIMIENTO INFORMADO – INFORMACIÓN AL PACIENTE

Antes de proceder a la firma de este consentimiento informado, lea atentamente la información que a continuación se le facilita y realice las preguntas que considere oportunas.

Naturaleza: Quisiéramos solicitar la colaboración y participación del paciente diagnosticado con Cardiopatía isquémica reclutando por la Cirugía Cardiovascular del hospital Carlos Haya, en un proyecto cuyo título es: “LAS CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES DE GRASA TÍMICA HUMANA COMO MEJOR FUENTE DE ANGIOGENESIS Y REGENERACIÓN DE TEJIDOS ISQUÉMICOS EN PERSONAS DE TERCERA EDAD”. La participación es estrictamente VOLUNTARIA. Los participantes pueden retirar su participación en cualquier momento y su tratamiento no se verá afectado por su decisión de participar o no en el proyecto. A los pacientes que acepten participar, se les informará por escrito de la naturaleza de la investigación y del uso que se a hacer de la información que se obtenga garantizándole la confidencialidad de los datos ya que se les entrevistará para tomar datos sobre su enfermedad y se les extraerá antes de la operación sangre periférica para los estudios bioquímicos y fenotipación de estos pacientes. Durante la intervención quirúrgica se extraerá la grasa tímica que será utilizada en la investigación.

Importancia: Al paciente se le informará de la importancia de tener sus propias células madre mesenquimales extraídas de su grasa tímica en la mejoría de su estado de salud.

Implicaciones para el donante/paciente:

- La donación/participación es totalmente voluntaria.
- El donante/paciente puede retirarse del estudio cuando así lo manifieste, sin dar explicaciones y sin que esto repercuta en sus cuidados médicos.
- Todos los datos carácter personal, obtenidos en este estudio son confidenciales y se tratarán conforme a la Ley Orgánica de Protección de Datos de Carácter Personal 15/99.

- La donación/información obtenida se utilizará exclusivamente para los fines específicos de este estudio.

Riesgos de la investigación para el donante/paciente: Los riesgos de la extracción de una parte de la grasa tímica son casi inexistentes, ya que el cirujano por la naturaleza de la intervención suele cortar una parte de esta grasa para poder acceder a la zona que requiere el bypass. Los riesgos de la extracción de sangre son mínimos, aunque pueden aparecer leves molestias en la zona del pinchazo, como dolor o sangrado. El estudio se adaptará al procedimiento quirúrgico habitual realizado en este hospital.

Aspectos éticos y confidencialidad

Todos los datos recogidos en este proyecto serán registrados de forma anónima, siguiendo estrictamente las leyes y normas de protección de datos en vigor (Ley 41/2002 de 14 de noviembre; Ley 15/1999 de 15 de diciembre).

Con el fin de proteger la confidencialidad de la información personal de los participantes se han tomado las siguientes medidas:

- 1- Todos los datos que puedan identificar al participante se mantendrán separados del resto de la información clínica.
- 2- Cada caso del estudio contará con un número de identificación que será el que figure en las bases de datos.
- 3- El análisis de la información se hará siempre de forma agregada y nunca individual.
- 4- Todos los investigadores implicados en el proyecto se comprometen a cumplir las normas necesarias para preservar la confidencialidad de la información facilitada por los participantes.
- 5- Todas las bases de datos del proyecto estarán protegidas electrónicamente con códigos que limiten el acceso únicamente a los investigadores del proyecto.

Si requiere información adicional se puede poner en contacto con nuestro personal de Investigación del laboratorio de investigación biomédica en el teléfono: 951032647/648 o en el correo electrónico: elbekay@gmail.com

CONSENTIMIENTO INFORMADO
CONSENTIMIENTO POR ESCRITO DEL PACIENTE

LAS CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES DE GRASA TÍMICA HUMANA
COMO MEJOR FUENTE DE ANGIOGENESIS Y REGENERACIÓN DE
TEJIDOS ISQUÉMICOS EN PERSONAS DE TERCERA EDAD

Yo (Nombre y Apellidos):

.....

- He leído el documento informativo que acompaña a este consentimiento (Información al Paciente)

He podido hacer preguntas sobre el estudio de “LAS CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES DE GRASA TÍMICA HUMANA COMO MEJOR FUENTE DE ANGIOGENESIS Y REGENERACIÓN DE TEJIDOS ISQUÉMICOS EN PERSONAS DE TERCERA EDAD”

He recibido suficiente información sobre el estudio de las células madre mesenquimales de grasa tímica humana como mejor fuente de angiogénesis y regeneración de tejidos isquémicos en personas de tercera edad

- He hablado con el profesional sanitario informador

.....

- Comprendo que mi participación es voluntaria y soy libre de participar o no en el estudio.

- Se me ha informado que todos los datos obtenidos en este estudio serán confidenciales y se tratarán conforme establece la Ley Orgánica de Protección de Datos de Carácter Personal 15/99.
- Se me ha informado de que la donación/información obtenida sólo se utilizará para los fines específicos del estudio.
- Deseo ser informado/a de mis datos genéticos y otros de carácter personal que se obtengan en el curso de la investigación, incluidos los descubrimientos inesperados que se puedan producir, siempre que esta información sea necesaria para evitar un grave perjuicio para mi salud o la de mis familiares biológicos.

Si No

Comprendo que puedo retirarme del estudio:

- Cuando quiera
- Sin tener que dar explicaciones
- Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos

Presto libremente mi conformidad para participar en el *proyecto titulado LAS CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES DE GRASA TÍMICA HUMANA COMO MEJOR FUENTE DE ANGIOGENESIS Y REGENERACIÓN DE TEJIDOS ISQUÉMICOS EN PERSONAS DE TERCERA EDAD.*

Firma del paciente
(o representante legal en su caso)

Firma del profesional sanitario
informador

Nombre y apellidos:.....

Nombre y apellidos:.....

Fecha:.....

Fecha:.....

RESULTADOS

Estudio 1: Análisis y comparación de los niveles de expresión de parámetros endoteliales, angiogénicos y adipogénicos en TAT y TAS en relación con el incremento de la edad.

Variables clínicas y biológicas de ambos grupos de pacientes (mediana edad - 45/65 años - y tercera edad - ≥ 70 años -).

La Tabla 1 muestra que no existen diferencias significativas en las variables clínicas y biológicas entre los dos grupos de pacientes estudiados.

	Mediana edad (n=18)	Tercera edad (n=17)	P
Edad (años)	45-65	≥ 70	
Glucosa (mg/dL)	131.40 \pm 16.94	123.71 \pm 19.80	NS
Triglicéridos (mg/dL)	132.50 \pm 16.30	121.29 \pm 17.54	NS
Colesterol (mg/dL)	119.90 \pm 13.92	146.33 \pm 9.01	NS
HDL-c (mg/dL)	26.10 \pm 1.62	32.67 \pm 2.43	NS
LDL-c (mg/dL)	79.20 \pm 9.91	95.00 \pm 5.54	NS
Ácido Úrico (mg/dL)	4.85 \pm 0.291	5.46 \pm 0.393	NS
Creatinina (mg/dL)	0.82 \pm 0.061	1.00 \pm 0.098	NS
Hb1Ac (%)	6.79 \pm 0.64	6.27 \pm 0.35	NS
IMC (kg/m²)	29.06 \pm 3.27	31.52 \pm 5.97	NS

Tabla 1. Variables clínicas y biológicas de los pacientes. Los valores se presentan como la media \pm error estándar. La relación entre ambos grupos de pacientes se analizó mediante test U de Mann-Whitney. HDL-c, colesterol HDL; LDL-c, colesterol LDL; Hb1Ac, hemoglobina glicosilada; IMC, índice de masa corporal. NS, No Significativo.

Comparación de los niveles de expresión génica y proteica de VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C y VEGF-D de tejido adiposo tímico y subcutáneo entre pacientes adultos de mediana y tercera edad con cardiomiopatía isquémica.

Los análisis de PCR cuantitativa mostraron que la expresión génica de VEGF-A en TAT estuvo incrementada de manera significativa en pacientes de tercera edad comparados con el grupo de mediana edad. En contraste, la expresión génica de VEGF-A en TAS estuvo significativamente disminuida en pacientes de tercera edad comparados con los de mediana edad (Figura 1A). También, la expresión génica de VEGF-B en TAT incrementó (no significativamente) en pacientes de tercera edad comparados con los de mediana edad, mientras que en TAS esta expresión estuvo significativamente disminuida en pacientes de tercera edad (Figura 1B). VEGF-C y VEGF-D, los cuales mostraron similares niveles de expresión en ambos tejidos en el grupo de mediana edad, estuvieron significativamente incrementados en TAT de pacientes de tercera edad, mientras que en TAS los niveles de estas dos isoformas fueron similares en ambos grupos (Figura 1C y D).

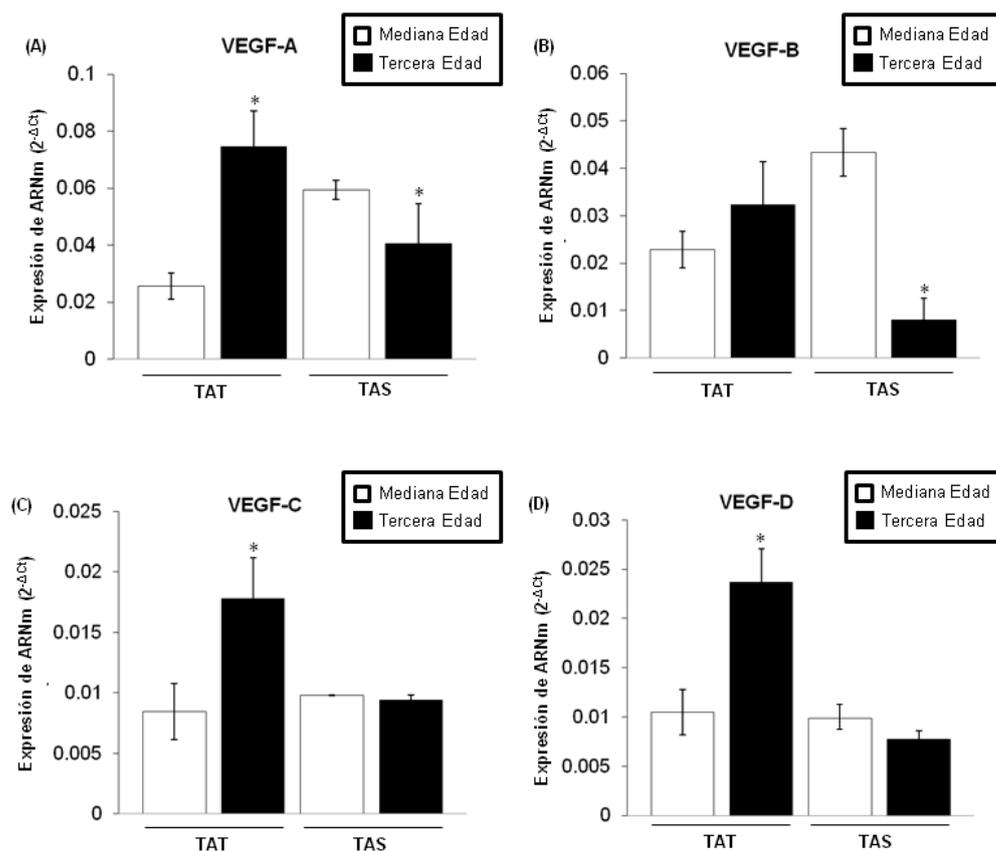


Figura 1. Expresión génica del ARNm de las isoformas del VEGF de TAT y TAS de sujetos de mediana y tercera edad con cardiopatía isquémica. El análisis de la expresión del ARNm de VEGF-A (A), VEGF-B (B), VEGF-C (C) y VEGF-D (D) fue realizado en el TAT y TAS de los dos grupos de sujetos con cardiopatía estudiados (mediana edad, 45-65 años, n=18 y tercera edad, >70 años, n=17). Los niveles de ARNm fueron normalizados con los valores de la ciclofilina. Los resultados se obtuvieron por triplicado y expresados como media ± error estándar. La relación entre ambos grupos de pacientes se analizó mediante test U de Mann-Whitney. * $p < 0.05$.

La expresión proteica de las isoformas VEGF fue también analizada en el TAT y TAS de pacientes de mediana y tercera edad. La Figura 2 muestra evidencias de la presencia de síntesis proteica de las cuatro isoformas VEGF en los dos tejidos adiposos de todos los sujetos. El análisis proteico confirmó los resultados obtenidos por PCR a tiempo real, mostrando claramente el incremento de las isoformas VEGF en el TAT de los sujetos de tercera edad comparados con los de mediana edad. Mientras que en TAS, los niveles proteicos de estas isoformas se mantuvieron similares, e incluso disminuyeron, en pacientes de tercera edad comparados con los de mediana edad.

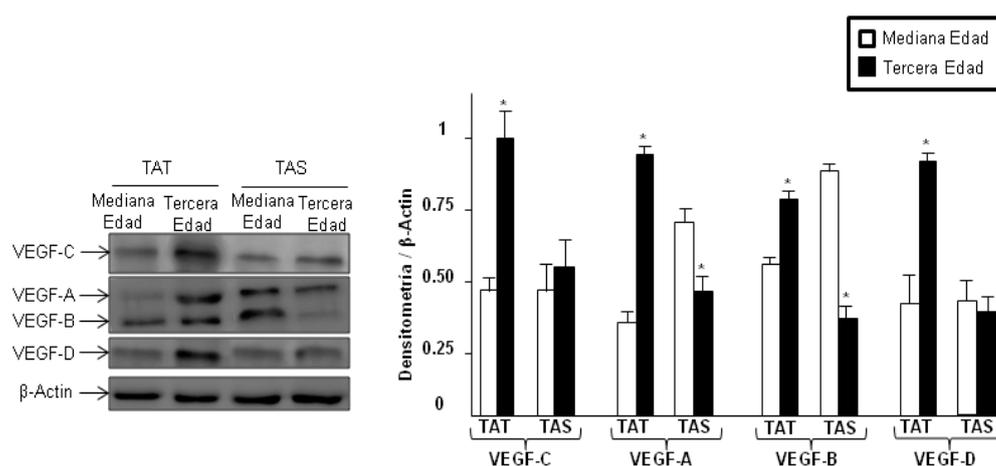


Figura 2. Análisis de Immunoblotting de las isoformas del VEGF de TAT y TAS de sujetos de mediana y tercera edad con cardiomiopatía isquémica. La marca resultante de cada isoforma fue comparada con la marca de la proteína constitutiva β -Actina. El análisis de densidad fue llevado a cabo mediante normalización de las muestras con la β -Actina utilizando el programa NIH's Image-J. La marca es la representación de tres experimentos independientes con muestras diferentes, * $p < 0.05$.

Comparación de los niveles de expresión génica y proteica de los marcadores endoteliales de tejido adiposo tímico y subcutáneo entre pacientes adultos de mediana y tercera edad con cardiomiopatía isquémica.

Todos los miembros de la familia VEGF estimulan la respuesta celular por unión a receptores con actividad tirosina kinasa (VEGFRs) en la superficie celular. VEGF-R1 (Flt-1), VEGF-R2 (Flk-1/KDR), y VEGF-R3 (Flt-4) son conocidos por mediar la vasculogénesis (receptores 1 y 2) y la linfangiogénesis (receptor 3). La figura 3 A, B y D muestra que VEGF-R1 y VEGF-R2 están altamente expresados en TAT en comparación con TAS. Además, los niveles de expresión de VEGF-R1 y VEGF-R2 en TAT fueron mayores en los pacientes de tercera edad comparados con los de mediana edad. En contraste, en TAS, los niveles de expresión de estos dos marcadores endoteliales no mostraron ninguna diferencia significativa entre los sujetos de tercera y mediana edad. Los niveles de expresión de VEGF-R3 fueron similares en el TAT de ambos grupos de pacientes, mientras que en TAS, el nivel de expresión génica de este receptor estuvo significativamente disminuido en pacientes de tercera edad comparados con los de mediana edad (Figura 3C), a pesar de que no se observaron diferencias significativas en la expresión proteica ni entre los diferentes grupos de pacientes ni entre ambos tejidos adiposos (Figura 3D).

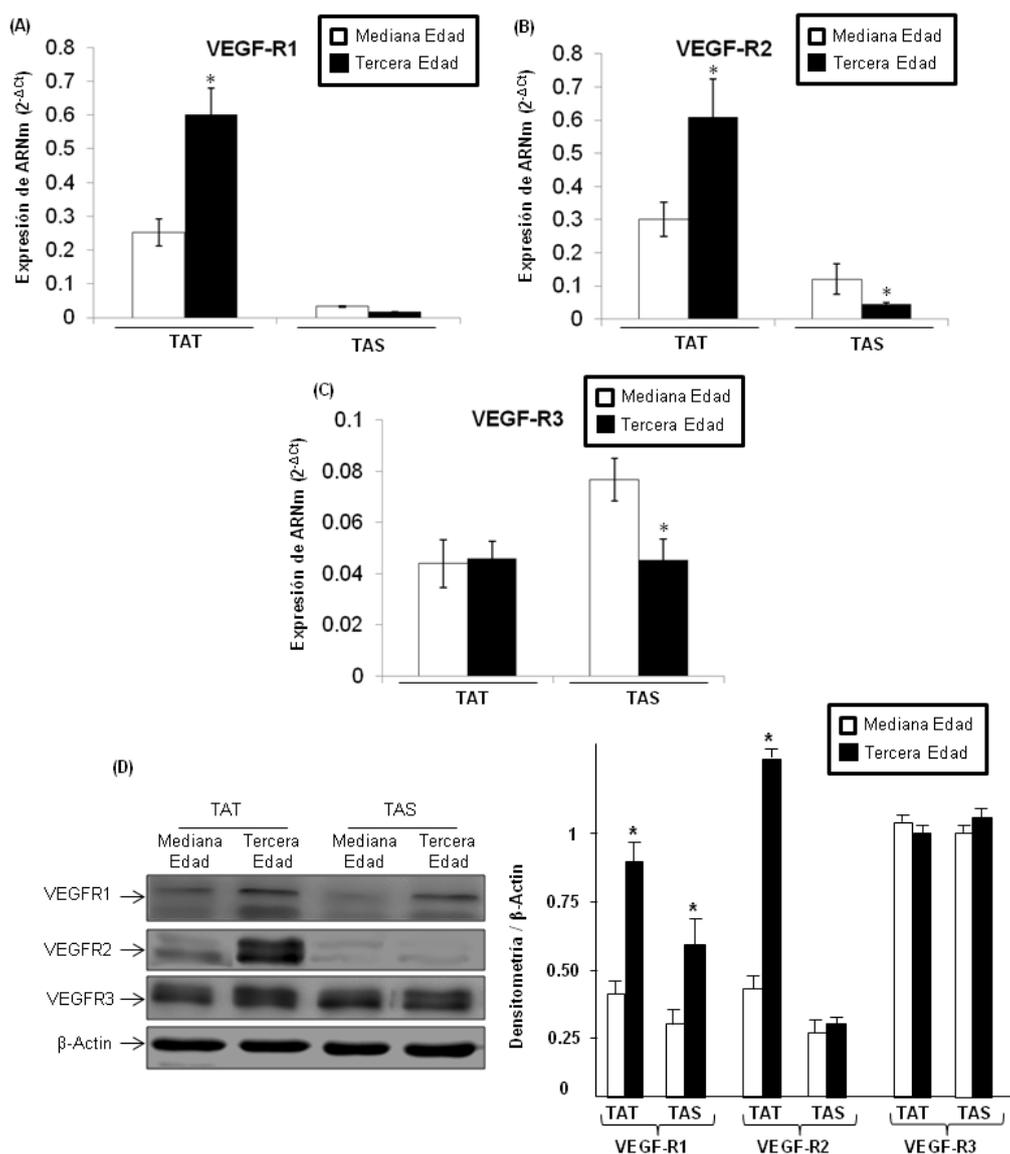


Figura 3. Expresión génica del ARNm y expresión proteica de los marcadores endoteliales de TAT y TAS de sujetos de mediana y tercera edad con cardiopatía isquémica. A-C; El análisis de la expresión del ARNm de los receptores de los factores endoteliales de crecimiento vascular fue realizado en el TAT y TAS de los dos grupos de sujetos con cardiopatía estudiados (mediana edad, 45-65 años, n=18 y tercera edad, >70 años, n=17). Los niveles de ARNm fueron normalizados con los valores de la ciclofilina. Los resultados se obtuvieron por triplicado y expresados como media \pm error estándar. La relación entre ambos grupos de pacientes se analizó mediante test U de Mann-Whitney. * $p < 0.05$. D; Análisis de Immunoblotting de VEGF-R1, VEGF-R2 y VEGF-R3. La marca resultante de cada isoforma fue comparada con la marca de la proteína constitutiva β -Actina. El análisis de densidad fue llevado a cabo mediante normalización de las muestras con la β -Actina utilizando el programa NIH's Image-J. La marca es la representación de tres experimentos independientes con muestras diferentes, * $p < 0.05$.

Se conoce bien que las interacciones adhesivas que se dan entre las células y la matriz extracelular tienen lugar para permitir la migración celular endotelial durante la angiogénesis. Estas interacciones están mediadas por integrinas las cuales unen ligandos en la matriz extracelular promoviendo la movilidad y proliferación celular endotelial. Por ello se ha medido qué aumento de la expresión génica de los factores angiogénicos se encontró acompañado por un incremento en la expresión de genes codificantes para marcadores de células progenitoras endoteliales controladoras de la diferenciación endotelial. La Figura 4 muestra que los niveles de expresión de CD90/Thy-1, CD31/PCAM-1 y CD29 de TAT se encontraron significativamente incrementados en pacientes de tercera edad comparados con los pacientes de mediana edad, mientras que estos niveles estuvieron disminuidos en el TAS de estos individuos comparados con los pacientes de mediana edad (Figuras 4 A-C). La cadena 1α de la integrina VLA1/CD49a, conocida por combinar con la subunidad 1β de CD29 para formar un receptor para colágeno y laminina, se observó altamente expresada en el TAT de ambos grupos de edad, mostrando similares niveles tanto en pacientes de tercera edad como en los de mediana edad. Los niveles de esta integrina fueron mucho menores en el TAS en comparación con el TAT, y dichos valores se vieron aún más disminuidos en los pacientes de tercera edad en comparación con los de mediana edad (Figura 4D).

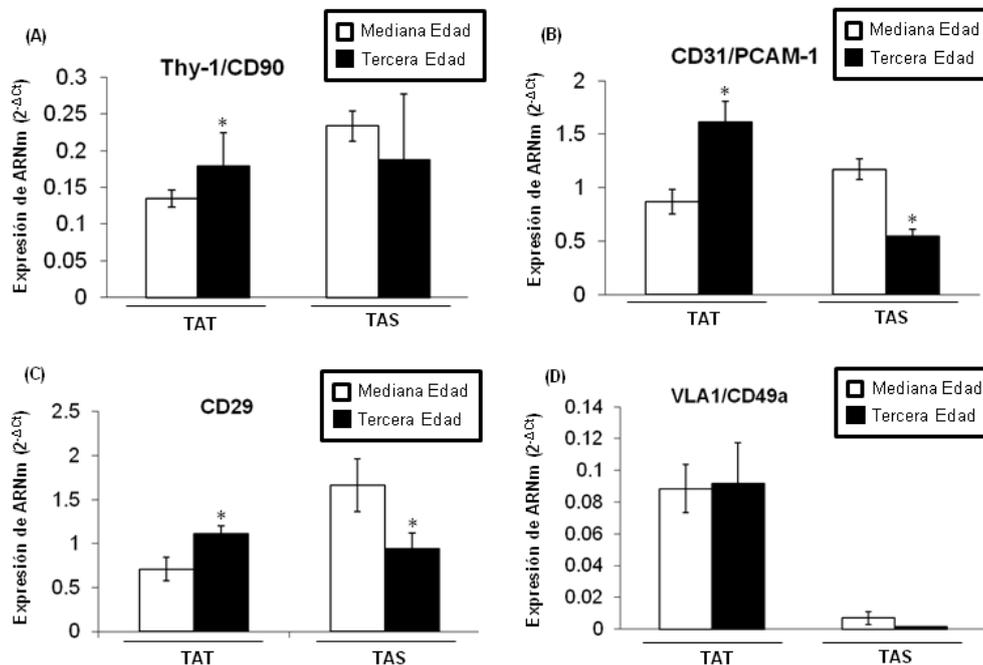


Figura 4. Expresión génica del ARNm de los marcadores integrinas de TAT y TAS de sujetos de mediana y tercera edad con cardiomiopatía isquémica. A-D; El análisis de la expresión del ARNm de los marcadores integrinas (Thy1/CD90, CD31/PCAM, CD29 y VLA1/CD49a) fue realizado en el TAT y TAS de los dos grupos de sujetos con cardiomiopatía estudiados (mediana edad, 45-65 años, n=18 y tercera edad, >70 años, n=17). Los niveles de ARNm fueron normalizados con los valores de la ciclofilina. Los resultados se obtuvieron por triplicado y expresados como media ± error estándar. La relación entre ambos grupos de pacientes se analizó mediante test U de Mann-Whitney. *p<0.05.

Para analizar si estas diferencias de expresión génica observadas se mantenían en la expresión proteica, se analizó la expresión de los marcadores endoteliales de superficie en la fracción estromal de ambos tejidos adiposos mediante citometría de flujo.

La tabla 2 muestra que la expresión de los marcadores de superficie Thy1/CD90, CD29 y CD49a/VLa1 estuvo incrementada en el TAT de los pacientes de tercera edad en comparación con los de mediana edad, mientras que en el TAS la expresión de estos marcadores de superficie disminuyó en el grupo de sujetos de tercera edad comparados con los de mediana edad. Las diferencias observadas en Thy1/CD90 y CD49a/VLA1 en el TAT fueron significativas, mientras que las diferencias observadas en la expresión de CD29 no lo fueron.

	TAT		TAS	
	Mediana Edad (n=6)	Tercera Edad (n=6)	Mediana Edad (n=6)	Tercera Edad (n=6)
Thy1/CD90	90.95± 2.31	97.78±3.35*	95.25 ± 9.41	83.95± 7.41*
CD29	96.31± 2.56	98.15±6.91	97.17± 6.43	85.35± 13.65*
CD49a/VLA1	48.02± 5.21	53.95± 1.49*	26.02± 1.85	21.85± 2.95

Tabla 2. Análisis de citometría de flujo para cuantificar la expresión de los marcadores endoteliales de superficie celular Thy1/CD90, CD29 y CD49a/VLA1 en la fracción vascular estromal de ambos tejidos adiposos, tímico y subcutáneo, de sujetos de mediana y tercera edad con cardiomiopatía isquémica. Las células de la fracción vascular estromal fueron preparadas para citometría de flujo como se ha descrito en el apartado de Materiales y Métodos. Los datos representan el porcentaje de células procedentes de la fracción vascular estromal del TAS y del TAT teñidas para los marcadores de superficie celular. Los valores presentados en la tabla expresan la media \pm error estándar de tres experimentos independientes. La relación entre ambos grupos de pacientes se analizó mediante test U de Mann-Whitney. * $p < 0.05$.

Comparación de los niveles de expresión génica y proteica de marcadores adipogénicos (PPAR γ 2, ADRP y FABP4) de tejido adiposo tímico y subcutáneo entre pacientes adultos de mediana y tercera edad con cardiomiopatía isquémica.

Los análisis de PCR cuantitativa mostraron que los niveles de expresión de PPAR γ 2, ADRP y FABP4 se encontraban significativamente incrementados en el TAT de pacientes de tercera edad en comparación con los niveles observados en el TAT de los de mediana edad, mientras que en el TAS estos niveles se mantuvieron o estuvieron ligeramente disminuidos (Figura 5 A-C). El análisis de Western Blotting mostró que los niveles proteicos de PPAR γ 2 y ADRP también estaban elevados en el TAS de sujetos de mediana edad en comparación con los del TAT; estos niveles se encontraron disminuidos de manera significativa en el TAS de los pacientes de tercera edad comparados con los de mediana edad, mientras que en TAT los niveles de estos dos marcadores adipogénicos estuvieron incrementados en los sujetos de tercera edad. Los niveles de proteínas de FABP4 fueron mayores en el TAS que en TAT en los pacientes de mediana edad, pero en los sujetos de tercera edad estos niveles estuvieron significativamente incrementados en el TAT alcanzando los niveles detectados en el TAS, donde los niveles de proteínas de estos marcadores adipogénicos se mantuvieron en niveles similares tanto en pacientes de mediana edad como en los de tercera edad (Figura 5D).

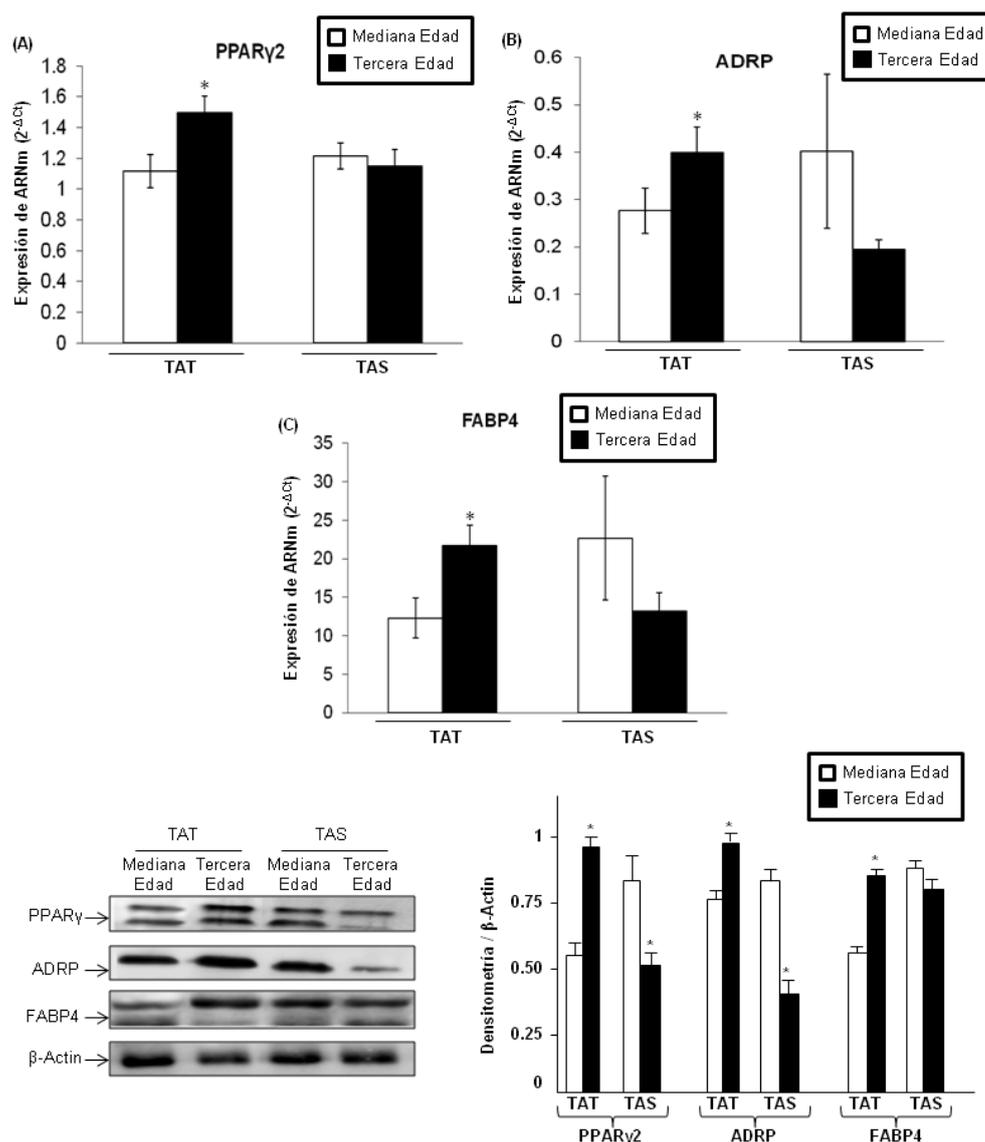


Figura 5. Expresión génica del ARNm y expresión proteica de los marcadores adipogénicos PPAR γ , ADRP y FABP4 de TAT y TAS de sujetos de mediana y tercera edad con cardiomiopatía isquémica. A-C; El análisis de la expresión del ARNm de PPAR γ , ADRP y FABP4 fue realizado en el TAT y TAS de los dos grupos de sujetos con cardiomiopatía estudiados (mediana edad, 45-65 años, n=18 y tercera edad, >70 años, n=17). Los niveles de ARNm fueron normalizados con los valores de la ciclofilina. Los resultados se obtuvieron por triplicado y expresados como media \pm error estándar. La relación entre ambos grupos de pacientes se analizó mediante test U de Mann-Whitney. * p <0.05. D; Análisis de Immunoblotting de PPAR γ , ADRP y FABP4. La marca resultante de cada isoforma fue comparada con la marca de la proteína constitutiva β -Actina. El análisis de densidad fue llevado a cabo mediante normalización de las muestras con la β -Actina utilizando el programa NIH's Image-J. La marca es la representación de tres experimentos independientes con muestras diferentes. * p <0.05.

Análisis de correlación.

El análisis de correlación de la edad de los pacientes con cardiomiopatía isquémica y la expresión génica de los marcadores angiogénicos en el TAT mostró una fuerte, positiva y significativa correlación entre estos parámetros, especialmente CD31, VEGF-A, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-R1, VEGF-R2, y VEGF-R3 los cuales correlacionaron altamente con la edad (Tabla 3).

	Edad (<i>r</i>)
CD31	0.446**
VEGF-A	0.469**
VEGF-C	0.339*
VEGF-D	0.397*
VEGF-R1	0.504**
VEGF-R2	0.463**

Tabla 3. Análisis de correlación entre la expresión de los marcadores angiogénicos y la edad en el TAT de pacientes con cardiomiopatía isquémica. Las correlaciones fueron determinadas mediante test de correlación de Spearman. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

Posteriormente se utilizó un análisis de correlaciones parciales para determinar la fortaleza de la asociación entre los niveles de expresión génica de estos marcadores angiogénicos en el TAT y la edad, tras controlar otras covariantes clínicas entre las que se incluyeron glucosa, IMC, triglicéridos, y colesterol (Tabla 4).

El análisis de correlación parcial mostró que los niveles de expresión de CD31, VEGF-R1, VEGF-R2, VEGF-A, y VEGF-C estaban correlacionados de manera independiente con la edad, indicando que esta asociación significativa no estaba mediada por la glucosa, el IMC, los triglicéridos o el colesterol. Sin embargo, las correlaciones de VEGF-R3 y VEGF-D con la edad se eliminaron cuando la glucosa, el IMC, los triglicéridos y el colesterol fueron controlados.

Covariantes confundentes	Glucosa	Triglicéridos	IMC	Colesterol
	Edad (<i>r</i>)			
CD31	0.647*	0.672*	0.448**	0.639**
VEGF-R1	0.727***	0.588**	0.529***	0.607*
VEGF-R2	0.678***	0.526**	0.482**	0.522**
VEGF-A	0.698**	0.529*	0.512**	0.525**

Tabla 4. Correlaciones parciales entre la expresión de los marcadores angiogénicos y la edad en el TAT de pacientes con cardiomiopatía isquémica controlando variables como glucosa, triglicéridos, IMC y colesterol. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; * $p \leq 0.005$.**

Además, cuando analizamos la correlación entre los marcadores adipogénicos (PPAR γ 2, FABP-4, y ADRP) y los marcadores angiogénicos (VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-R1, VEGF-R2, and VEGF-R3) en el TAT, observamos una fuerte correlación positiva entre estos parámetros (Tabla 5), mientras que en el tejido adiposo subcutáneo estas correlaciones fueron negativas (datos no mostrados).

(r)	VEGF-R1	VEGF-R2	VEGF-R3	PPAR γ 2	ADRP	FABP4	CD31
VEGF-A	0.955**	0.979**		0.456**	0.653**	0.744**	0.393*
VEGF-B				0.392*	0.306*	0.395*	
VEGF-C		0.320*		0.385*	0.389*	0.364*	0.371*
VEGF-D	0.461**		0.522**	0.338*	0.574***	0.565**	
VEGF-R1				0.386*			0.459**
VEGF-R2				0.417*		0.282*	
VEGF-R3							0.419*
PPAR γ 2	0.386*	0.417*					
FABP4							0.327*
ADRP							0.380*

Tabla 5. Análisis de correlación entre la expresión de los marcadores angiogénicos y los adipogénicos en el TAT de pacientes con cardiopatía isquémica. Las correlaciones fueron determinadas mediante test de correlación de Spearman. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p \leq 0.005$.

Ensayo *in vivo* en membrana corioalantoidea de codorniz (chrioallantoic membrane – CAM).

El ensayo CAM se utiliza frecuentemente para determinar la capacidad que poseen ciertos compuesto para inhibir/estimular la angiogénesis *in vivo*. En los controles los vasos sanguíneos forman una densa red ramificada orientada espacialmente que se compone de estructuras vasculares de diámetro variable, progresivamente más pequeño desde la rama central (Martínez-Poveda B. y col.; 2008). Los fragmentos de tejido adiposo implantados sobre la CAM de embriones de codorniz indujeron una fuerte respuesta angiogénica provocando la formación de una red vascular circundante a la zona de inserción de la grasa. En la figura 6 se aprecian las células vasculares en color verde alrededor de los adipocitos tras la estimulación angiogénica que se produce por inserción del tejido adiposo, bien de Timo (Figura 6A, B y C) o bien Subcutáneo (Figura 6D, E y F). La señal detectada ante la presencia de un fragmento de tejido adiposo de timo fue más fuerte que la encontrada ante uno de tejido adiposo subcutáneo, no apreciándose diferencias llamativas en cuanto a la estimulación provocada por fragmentos pertenecientes al mismo tipo de tejido adiposo pero procedentes de sujetos de diferente edad (A y D: tejido de paciente del grupo de tercera edad; B, C, E y F: tejidos de dos pacientes del grupo de mediana edad). Signos de inflamación derivados de la manipulación de la CAM, tales como un blanqueamiento de la misma, no se observaron en nuestros ensayos.

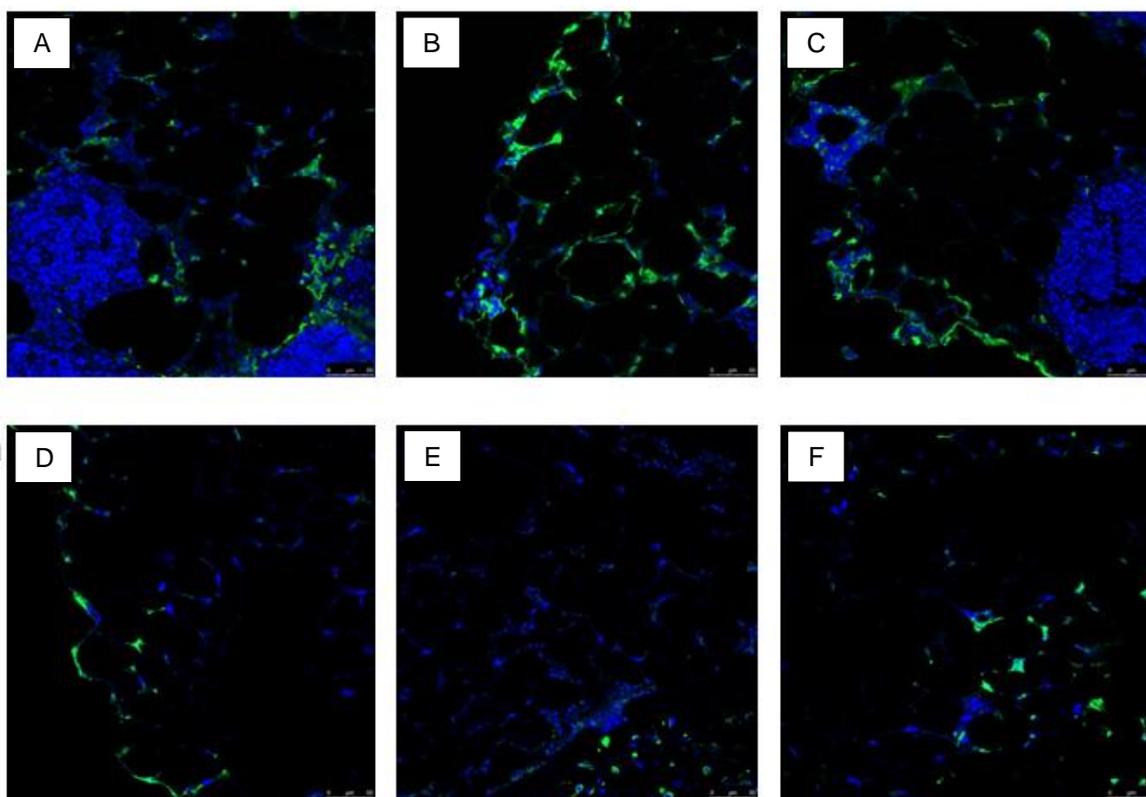


Figura 6. Efecto de la implantación de fragmentos de tejido adiposo sobre la CAM de huevos de codorniz. Las células vasculares aparecen en verde como resultado de una respuesta positiva a incubación con el anticuerpo QH1. Los núcleos celulares se aprecian de color azul. La CAM se incubó durante 48 horas en presencia de un fragmento de 2x2mm de tejido adiposo de timo (A, B, C) o de tejido adiposo subcutáneo (D, E, F) procedentes de sujetos de mediana (B, C, E y F) y tercera (A y D) edad con cardiopatía isquémica.

Estudio 2: Caracterización de células mesenquimales procedentes de TAT y TAS en relación con el incremento de la edad

VARIABLES CLÍNICAS Y BIOLÓGICAS DE AMBOS GRUPOS DE PACIENTES (MEDIANA EDAD - 45/65 AÑOS - Y TERCERA EDAD - ≥70 AÑOS -).

La Tabla 6 muestra que no existen diferencias significativas en las variables clínicas y biológicas entre los dos grupos de pacientes estudiados.

	Mediana Edad (n=8)	Tercera Edad (n=18)	P
Edad (años)	45.65	≥70	
Triglicéridos (mg/dL)	149.00 ± 20.67	129.0 ± 20.72	NS
Colesterol (mg/dL)	180.50 ± 12.92	183.92 ± 8.48	NS
HDL-c (mg/dL)	50.63 ± 8.86	49.08 ± 3.34	NS
LDL-c (mg/dL)	101.58 ± 10.86	109.03 ± 6.28	NS
Creatinina (mg/dL)	1.085 ± 0.14	1.36 ± 0.36	NS
Hb (%)	13.33 ± 0.67	12.31 ± 0.42	NS
Hematocrito (%)	40.53 ± 1.87	37.97 ± 1.35	NS
IMC (kg/m²)	30.59 ± 1.19	28.08 ± 0.88	NS

Tabla 6. Variables clínicas y biológicas de los pacientes. Los valores se presentan como la media ± error estándar. La relación entre ambos grupos de pacientes se analizó mediante test U de Mann-Whitney. HDL-c, colesterol HDL; LDL-c, colesterol LDL; Hb, hemoglobina; IMC, índice de masa corporal. NS, No Significativo.

Ensayo de proliferación celular (curva de crecimiento celular) de células mesenquimales procedentes de la SVF de TAT y TAS.

Para el análisis de la proliferación de las células mesenquimales procedentes de la SVF de TAT y TAS se utilizó el método de conteo celular con cámara de Neubauer, tal y como se ha descrito en el apartado de materiales y métodos. Las curvas de crecimiento celular obtenidas con este método mostraron diferencias significativas para ambos tejidos respecto al número de células totales observadas en cada día de seguimiento, sin embargo, muestran similar patrón de crecimiento (Figura 7). Dichas curvas de crecimiento mostraron que en el día 1 del cultivo, cuando aún están las células en fase de latencia (lag), las células aumentan su número celular en una pequeña proporción, lo cual es debido a que esta fase se considera una fase de adaptación a las condiciones del cultivo. A partir del día 5 de cultivo se observa un patrón de crecimiento continuo, lo cual puede corresponderse con la fase de crecimiento exponencial (log) o de rápido crecimiento celular. Esta tendencia se mantiene hasta el último día de conteo celular con la existencia de dos picos muy acentuados en los días 15 y 23. Previo al pico celular del día 23 se observa una bajada del número de células del cultivo. Este descenso celular del día 21 se recupera de manera rápida alcanzando y superando en los dos días siguientes los niveles celulares. No parece apreciarse que, en los días utilizados para el conteo, las células entren en fase de senescencia y muerte, donde se hubiera observado un descenso o, al menos mantenimiento, del número de células existentes en el cultivo.

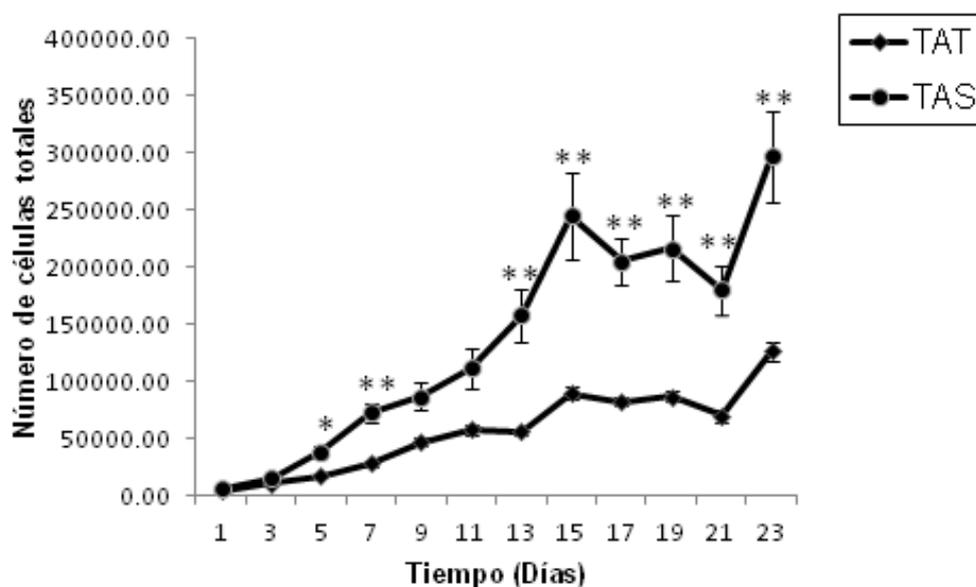


Figura 7. Curvas de proliferación celular de las células mesenquimales procedentes de la fracción del estroma vascular de ambos tejidos adiposos, tímico y subcutáneo, de sujetos con cardiomiopatía isquémica. Los valores presentados en la tabla expresan la media de los valores de conteo obtenidos de 5 pacientes diferentes realizados por triplicado \pm error estándar. La relación entre ambos tejidos adiposos se analizó mediante test U de Mann-Whitney. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

El tiempo necesario para que la población celular procedente de la SVF de los tejidos adiposos de timo y subcutáneo cultivadas en pase tres duplicara su número de células se muestra en la tabla 7, no existiendo diferencias significativas entre ambos tiempos de doblaje poblacional (PDs).

	PDs (horas)	P
TAT	103.13 \pm 8.24	NS
TAS	88.86 \pm 6.89	NS

Tabla 7. Tiempo de doblaje poblacional de las células procedentes de la SVF del TAT y TAS sujetos con cardiomiopatía isquémica. Los valores se presentan como la media \pm error estándar. La relación entre ambos tipos de tejido se analizó mediante test U de Mann-Whitney. NS. No Significativo.

Ensayo de Unidades Formadoras de Colonias Fibroblastoides (CFU-F assay).

Mediante el ensayo de unidades formadoras de colonias fibroblásticas se estima el porcentaje de células capaces de formar colonias dentro de una población celular.

Las células, sembradas en pocillos a una baja densidad celular (50 células/cm²) se observaron mediante microscopía invertida (Figura 8A). Estas células formaron colonias como Unidades Formadoras de Colonias Fibroblastoides (CFU-F) tras 14 días en condiciones estándar de cultivo, sin medio de diferenciación, y muestran una morfología tipo fibroblástica (Figura 8B y C), alargada y aplanada, compatibles con colonias clonogénicas, característica esencial de las células mesenquimales.

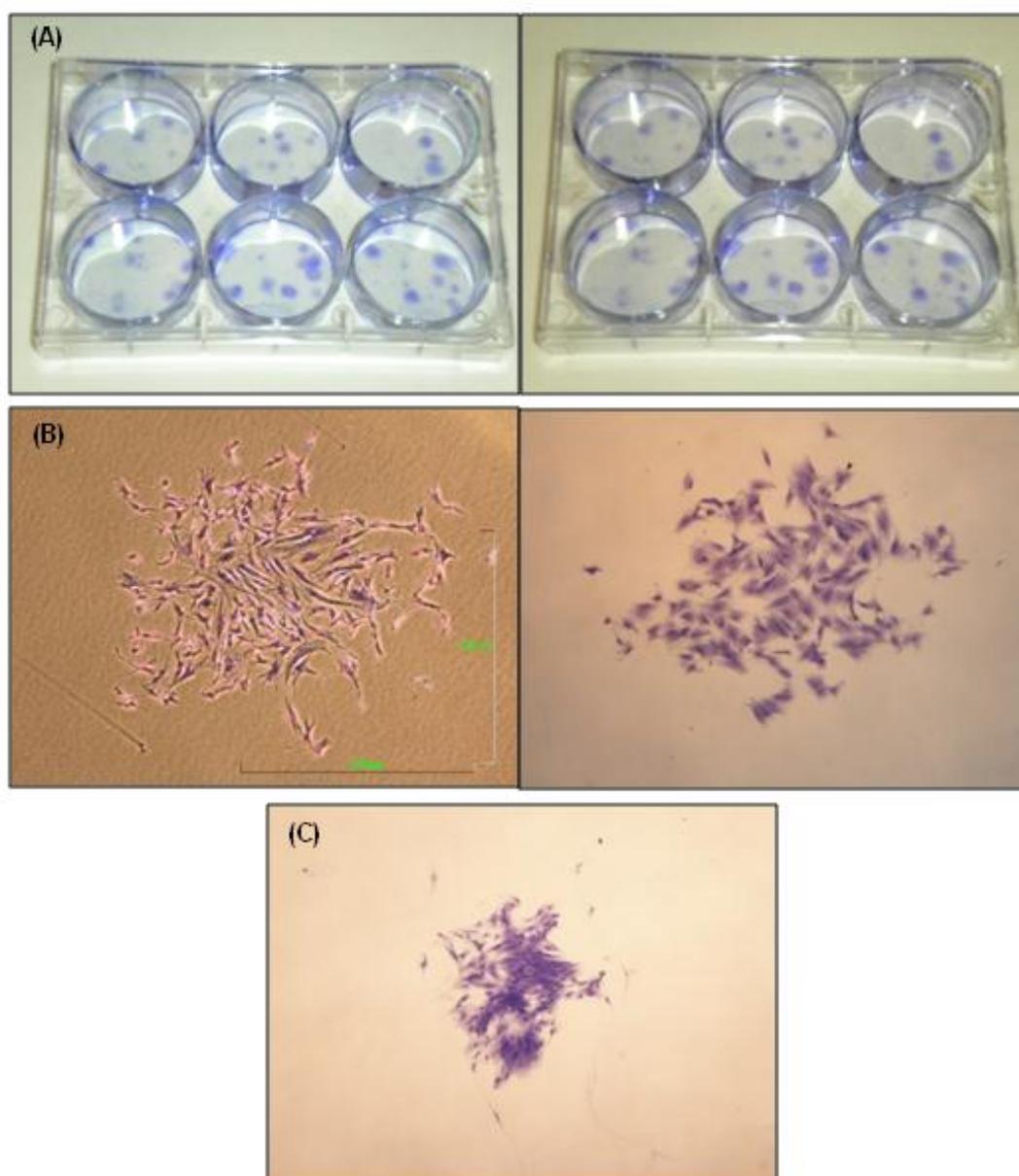


Figura 8. Ensayo de unidades formadoras de colonias fibroblastoides (CFU-F assay) de células procedentes de la fracción del estroma vascular de ambos tejidos adiposos, tímico y subcutáneo, de sujetos con cardiomiopatía isquémica. Las células se siembran en pocillos a una densidad baja (50 células/cm^2) y tras 14 días en condiciones estándar de cultivo y tinción con cristal violeta al 0.5% se observan con microscopio invertido (Figura 7A). Se observan células de tamaño considerable con prolongaciones citoplasmáticas que se disponen en colonias aisladas (Figura 7B y C); dichas colonias posteriormente se unificarán formando una monocapa. Aumentos: 4X.

El número de colonias que se formaron dentro de nuestra población celular en estudio se muestra en la figura 9. El número medio de colonias formadas en ambos tipos de tejidos adiposos fue similar (TAT= 7.45 ± 1.29 colonias y TAS= 8.55 ± 1.42 colonias), no existiendo diferencias significativas entre la pequeña variación numérica que se aprecia.

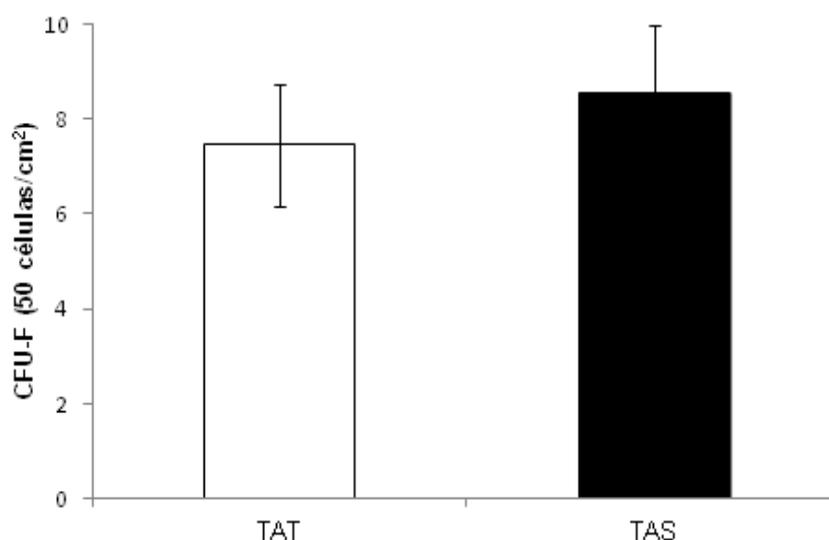


Figura 9. Número de colonias formadas tras 14 días de cultivo por células en pase tres procedentes de la SVF del TAT y TAS de sujetos con cardiomiopatía isquémica. Las células fueron sembradas a una densidad de 50 células/cm². Los valores presentados en la figura expresan la media de los valores de conteo de colonias obtenidos de 5 pacientes diferentes realizando 4 réplicas en cada uno de ellos (siembra de 4 pocillos por paciente y tejido) \pm error estándar. La relación entre ambos tejidos adiposos se analizó mediante test U de Mann-Whitney.

Caracterización Inmunofenotípica de las células de la SVF mediante citometría de flujo.

Tras obtener la confluencia necesaria en la placa (90%) de las células adherentes con morfología fibroblastoide se analizó mediante citometría de

flujo la expresión de los marcadores endoteliales de superficie celular para conocer los tipos celulares presentes en la SVF de los dos tejidos adiposos en estudio. Las células presentes en nuestros cultivos derivadas de las fracciones del estroma vascular de ambos tejidos adiposos son positivas a los tradicionales marcadores de células madre mesenquimales CD105, CD73, CD90, CD29 y CD44 y negativas para CD45, CD34, CD14 y HLA-DR, a pesar de que el porcentaje de células positivas para CD34 y CD14 fue algo elevado en el caso de células procedentes de TAT. CD19 mostró un porcentaje celular elevado para ambos tejidos adiposos, no llegando en ninguno de los dos casos al 50% de células positivas. La tabla 8 muestra que las células procedentes del TAT de los pacientes analizados presentan incrementada de manera significativa la expresión de los marcadores de superficie CD34, CD14 y CD133 en comparación con las células del TAS. La expresión de los restantes marcadores de superficie analizados se mantuvo en niveles similares y sin diferencias significativas en ambos tipos de tejidos adiposos, siendo en muy pocos casos superior su expresión en el TAT respecto al TAS.

Tabla 8. Análisis de citometría de flujo para cuantificar la expresión de los marcadores endoteliales de superficie celular CD34, CD45, Thy1/CD90, CD105, CD73, CD19, CD14, HLA_DR, CD31, CD146, CD133, CD144, CD140A, CD140B, CD166, CD106, CD29 y CD49D y CD44 en la SVF de TAT y TAS de sujetos con cardiomiopatía isquémica. Las células de la SVF fueron preparadas para citometría de flujo como se ha descrito en el apartado de Materiales y Métodos. Los datos representan el porcentaje de células procedentes de la fracción vascular estromal del TAS y del TAT teñidas para los marcadores de superficie celular. Los valores presentados en la tabla expresan la media \pm error estándar de cinco experimentos independientes. La relación entre ambos tejidos adiposos se analizó mediante test U de Mann-Whitney. * $p < 0.05$.

<i>-Tabla 8 -</i>	Timo (N=5)	Subcutáneo (N=5)
CD105	81.21 ± 4.46	81.61 ± 6.18
CD73	97.68 ± 0.54	98.07 ± 0.42
CD90	97.47 ± 0.44	98.88 ± 0.28
CD45	6.42 ± 0.59	8.36 ± 2.38
CD34	35.496 ± 7.44 *	3.38 ± 1.32
CD14	23.81 ± 11.76 *	6.00 ± 1.12
CD19	40.48 ± 10.51	46.94 ± 13.02
HLA-DR	0.51 ± 0.28	0.35 ± 0.14
CD29	59.52 ± 11.69	81.98 ± 8.58
CD44	80.34 ± 8.27	93.29 ± 2.91
CD146	1.03 ± 0.63	1.30 ± 0.56
CD166	97.99 ± 0.60	98.90 ± 0.10
CD106	68.636 ± 7.91	60.38 ± 11.69
CD49D	71.98 ± 10.44	79.96 ± 10.46
CD31	0.64 ± 0.10	0.97 ± 0.39
CD144	2.17 ± 0.43	2.77 ± 0.62
CD140A	3.68 ± 0.99	2.54 ± 1.36
CD140B	87.66 ± 5.74	87.19 ± 7.20
CD133	27.06 ± 6.82 *	3.29 ± 0.50

Evaluación cualitativa y cuantitativa del potencial de diferenciación adipogénico y osteogénico.

La caracterización biológica de las células de la SVF cultivadas en medios específicos para su diferenciación hacia linaje adipogénico u osteogénico se comprobó, en primer lugar, mediante tinción de vacuolas lipídicas intracelulares con Oil Red O y tinción de deposiciones de fosfato de calcio con Alizarin red, respectivamente. El control negativo de las tinciones de Oil Red O y Alizarín Red se realizó con células de la SVF no diferenciadas cultivadas en medio de expansión.

La figura 10 muestra células de la SVF diferenciadas hacia adipoblastos. Las vacuolas lipídicas citoplasmáticas que aparecieron tras 14 días de la inducción de diferenciación adipogénica se encuentran teñidas de color rojo, lo cual indica que la coloración para el Oil Red O fue positiva. La morfología de las células diferenciadas es compatible con adipocitos multiloculares.

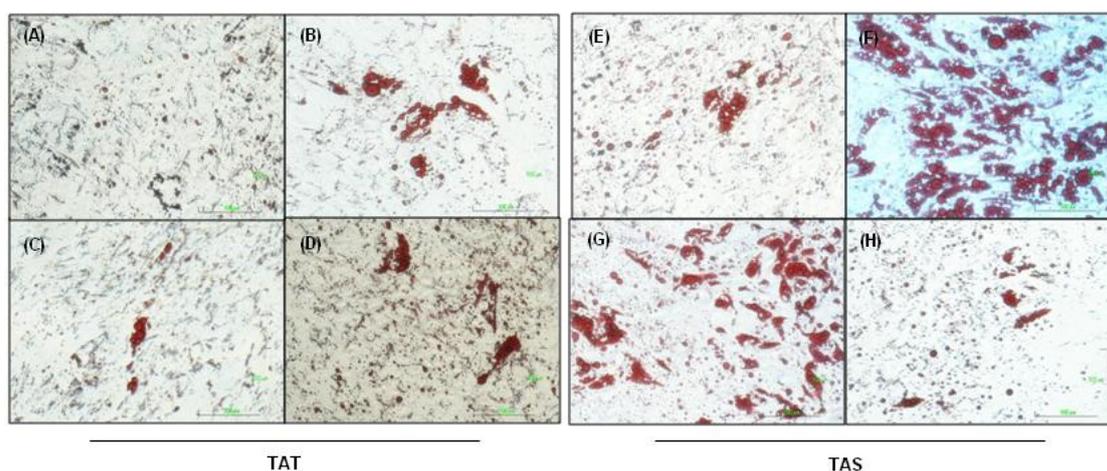


Figura 10. Coloración de Oil Red O positiva para células de la SVF de TAT y TAS procedentes de pacientes de mediana y tercera edad con cardiomiopatía isquémica diferenciadas a adipoblastos. Marcaje con Oil red O de adipocitos derivados de las células de la SVF del TAT (A, B y C) y del TAS (E, F y G) de tres donantes de tercera edad (>70 años) con múltiples vacuolas lipídicas dentro de su citoplasma. Marcaje con Oil red O de adipocitos derivados de las células de la SVF del TAT (D) y del TAS (H) de un donante de mediana edad (45-65 años) con múltiples vacuolas lipídicas dentro de su citoplasma. Aumentos: 20X.

Las células de SVF diferenciadas hacia células de linaje osteogénico se observan en la figura 11. Las células pierden su morfología original y adoptan una tipo “estrella”, característica de osteoblastos. Las células positivas para la tinción de Alizarín red se visualizan teñidas de color rojizo, lo cual pone de manifiesto la presencia de mineralización (deposiciones de fosfato de calcio) en el cultivo tras 14 días de la inducción de diferenciación.

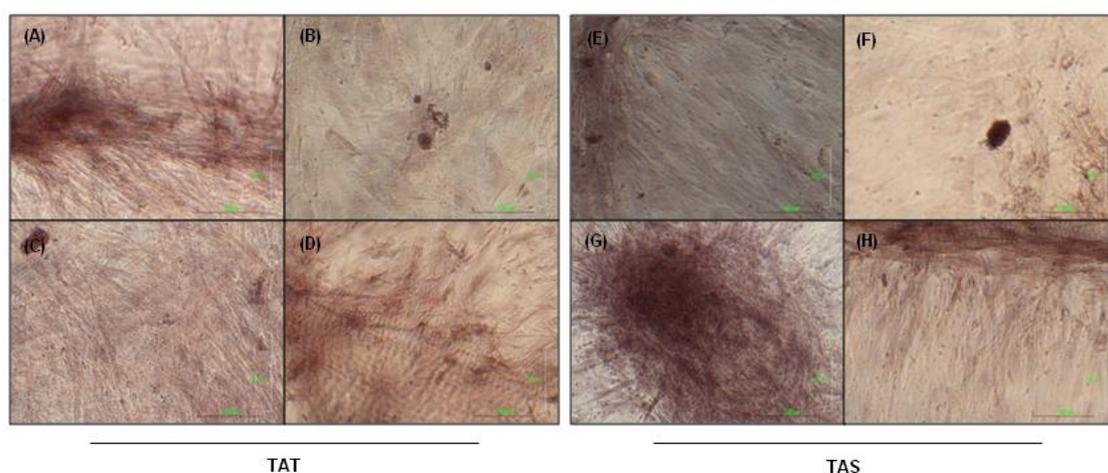


Figura 11. Coloración de Alizarín red positiva para mineralización en el cultivo de células de la SVF de TAT y TAS procedentes de pacientes de tercera y mediana edad media con cardiomiopatía isquémica diferenciadas hacia osteoblastos. Depositiones de fosfato de calcio (nódulos de mineralización) marcadas con Alizarín red en células de la SVF procedentes del TAT (A, B y C) y del TAS (E, F y G) de tres donantes de tercera edad (>70 años) diferenciadas a linaje osteogénico. Osteocitos derivados de las células de la SVF del TAT (D) y del TAS (H) de un donante de mediana edad (45-65 años) que presentan coloración positiva para la tinción con Alizarín red en sus nódulos de mineralización. Aumentos: 20X.

A pesar de que las tinciones utilizadas en nuestros estudios de diferenciación son las consideradas por la Sociedad internacional de Terapia Celular (*ISCT, Internacional Society Cellular Therapy*) como pruebas “*gold standar*” para considerar válida la diferenciación *in vitro* de las células madre mesenquimales (Dominici M. y col.; 2006), existen otros métodos que también ratifican la veracidad de la diferenciación hacia los posibles linajes

mencionados, por ello la caracterización biológica de las células de la SVF cultivadas en medios específicos para su diferenciación se comprobó de manera cuantitativa mediante análisis de la expresión de genes específicos de adipocitos (SERBP1, PPAR γ , FABP4, LPL, FASN, ADRP y CEBP α) o de osteocitos (ALPL -fosfatasa alcalina-, BGLAP -osteocalcina-, SPP1 -osteopontina-, SPARC -osteonectina-) mediante PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR). Los análisis de PCR cuantitativa mostraron que los niveles de expresión de FABP4, LPL, FASN, ADRP y CEBP α (Figura 12 A, B, C, D y E) se encontraban incrementados en todos los casos en los que se habían cultivado las células de la SVF en medio específico para su diferenciación hacia linaje adipogénico (pocillos de adipogénesis; células cultivadas en medio de inducción adipogénica) con respecto a aquéllas células en las que no se indujo diferenciación (pocillos control; en medio de expansión). De hecho, estos niveles fueron significativos para todos los genes en la diferenciación adipogénica de ambos tejidos adiposos, TAT y TAS, de las células de la SVF procedentes de pacientes de tercera edad, mientras que sólo fueron significativos en el caso de LPL, FASN y CEBP α de las células de la SVF sometidas a diferenciación procedentes de pacientes de mediana edad. Los niveles de expresión de las células de la SVF cultivadas en medio específico para su diferenciación hacia linaje osteogénico (Figura 12F) también se encontraron incrementados de manera significativa en el TAT y en el TAS de sujetos de tercera edad en comparación con aquéllas células en las que no se indujo diferenciación (pocillos control; medio de expansión). En pacientes de mediana edad estos valores sólo fueron significativos en las células del TAT sometidas a diferenciación.

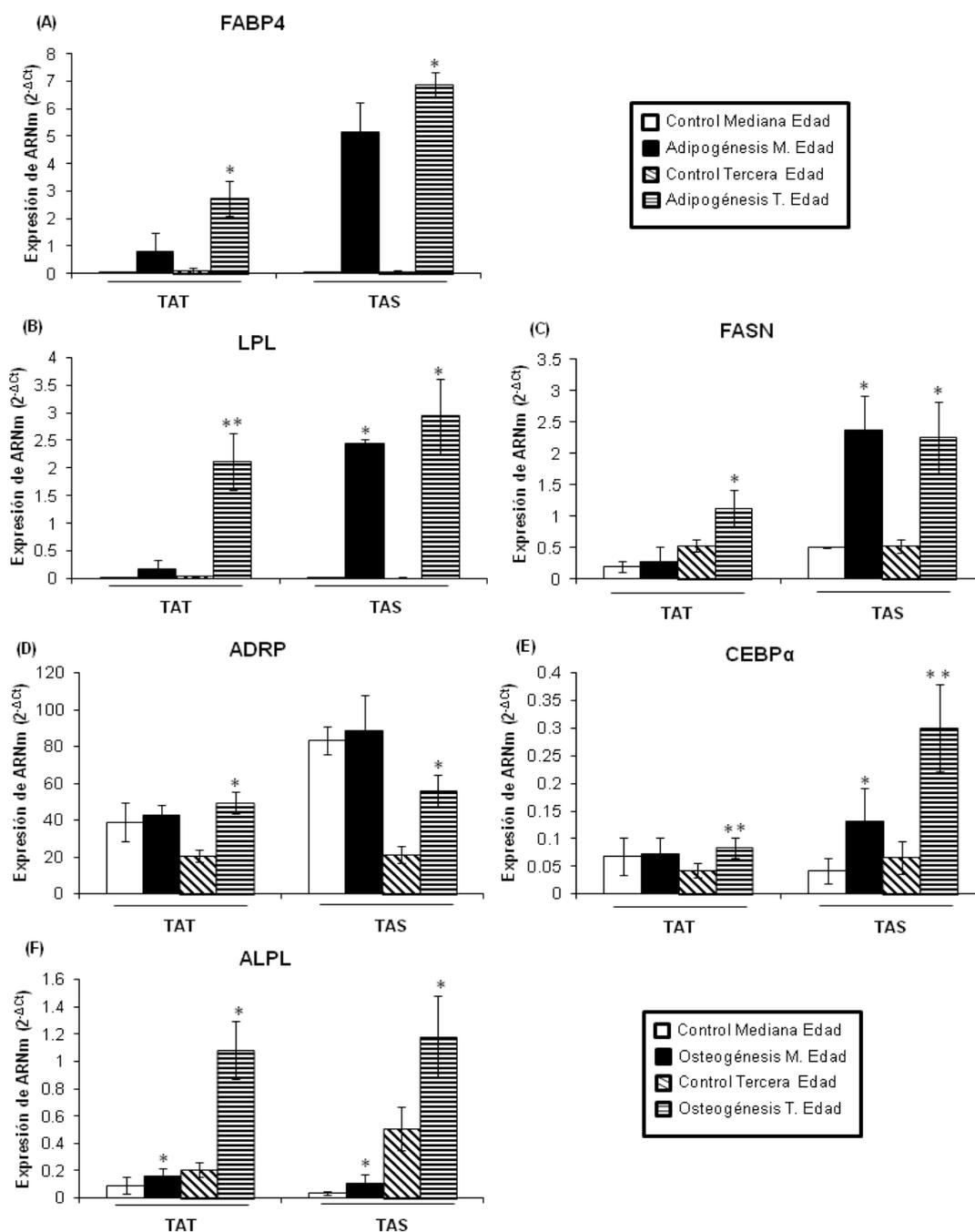


Figura 12. Expresión génica del ARNm de los marcadores adipogénicos FABP4, LPL, FASN, ADRP y CEBP α y del marcador osteogénico ALPL de TAT y TAS de sujetos de mediana y tercera edad con cardiomiopatía isquémica. El análisis de la expresión del ARNm de FABP4, LPL, FASN, ADRP y CEBP α (A-E) y de ALPL (F) fue realizado en el TAT y TAS de los dos grupos de sujetos con cardiomiopatía estudiados (mediana edad, 45-65 años, n=8 y tercera edad, >70 años, n=18). Los niveles de ARNm fueron normalizados con los valores de la ciclofilina. Los resultados se obtuvieron por triplicado y expresados como media \pm error estándar. La relación entre los pocillos control y los sometidos a diferenciación adipogénica y osteogénica se analizó mediante una prueba de rangos con signo de Wilcoxon. * $p < 0.05$; ** $p < 0.001$.

Evaluación cuantitativa del potencial de diferenciación endotelial.

La caracterización biológica de las células de la SVF cultivadas en medio específico para promover su diferenciación hacia células endoteliales se comprobó de manera cuantitativa mediante análisis de la expresión de genes específicos del linaje endotelial como CD31 (PECAM-1), CD309 (VEGFR-2, KDR, Flk-1 -mouse-), CD34 y VWF (factor de Von Willebrand) mediante PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR).

Los análisis de PCR cuantitativa mostraron que los niveles de expresión de CD31, CD309, CD34 y VWF (Figura 13 A, B, C y D) se encontraban incrementados en todos los casos en los que se habían cultivado las células de la SVF en medio específico para su diferenciación hacia células endoteliales (pocillos de Dif. Endot.; células cultivadas en medio de inducción hacia linaje endotelial) con respecto a aquellas células en las que no se indujo diferenciación (pocillos control; células cultivadas en medio de expansión). Esta diferenciación sólo mostro niveles significativos en el caso de las células de la SVF sometidas a diferenciación procedentes del TAS de pacientes de tercera edad para los marcadores CD31 y CD34.

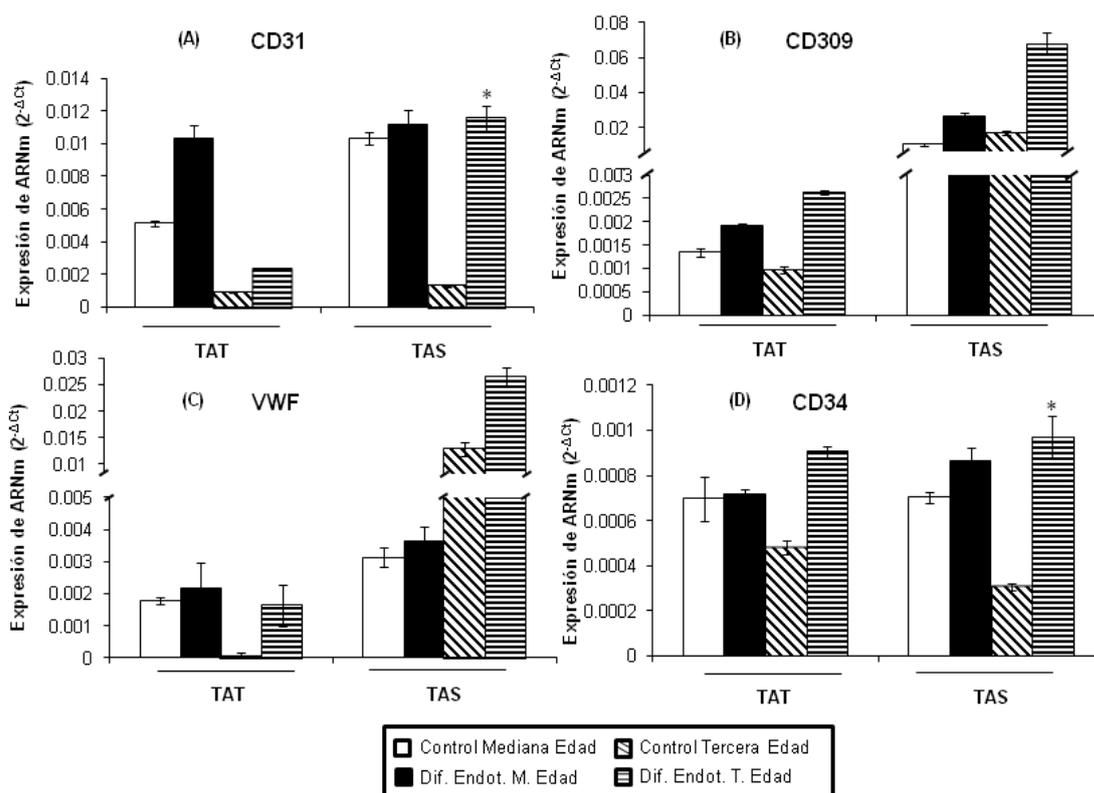


Figura 13. Expresión génica del ARNm de los marcadores de diferenciación endotelial CD31, CD309, VWF y CD34 de TAT y TAS de sujetos de mediana y tercera edad con cardiomiopatía isquémica. El análisis de la expresión del ARNm de CD31, CD309, VWF y CD34 (A-D) fue realizado en el TAT y TAS de los dos grupos de sujetos con cardiomiopatía estudiados (mediana edad, 45-65 años, n=5 y tercera edad, >70 años, n=8). Los niveles de ARNm fueron normalizados con los valores de la ciclofilina. Los resultados se obtuvieron por triplicado y expresados como media \pm error estándar. La relación entre los pocillos control y los sometidos a diferenciación adipogénica y osteogénica se analizó mediante una prueba de rangos con signo de Wilcoxon. * $p < 0.05$.

Comparación de los niveles de expresión génica de marcadores adipogénicos (FASN, ADRP y CEBP α), marcadores osteogénicos (ALPL) y marcadores endoteliales (CD31, CD309, VWF y CD34) de tejido adiposo tímico y subcutáneo entre pacientes adultos de mediana y tercera edad con cardiomiopatía isquémica.

Los análisis de PCR cuantitativa mostraron que los niveles de expresión de FASN, ADRP y CEBP α se encontraban incrementados (no de manera significativa) en el TAT de pacientes de tercera edad en comparación con los niveles observados en el TAT de los sujetos con edad media, mientras que en el TAS estos niveles sólo se incrementaron en el caso de ADRP y CEBP α , presentándose ligeramente disminuidos para FASN (Figura 14 A-C). Por su parte, la expresión génica de ALPL en el TAT estuvo incrementada de manera significativa en pacientes de tercera edad comparados con el grupo de pacientes de mediana edad. En contraste, la expresión génica de ALPL en el TAS estuvo significativamente disminuida en pacientes de tercera edad comparados con los de mediana edad (Figura 14D). En el caso de los marcadores endoteliales, los niveles de expresión de CD309, VWF y CD34 resultaron incrementados tanto en el TAT como en el TAS de pacientes de tercera edad en comparación con los niveles encontrados en los sujetos de mediana edad (Figura 15 B-D). Esta mista tendencia se encontró para la expresión del marcador CD31 en TAS, ya que en el TAT la expresión de CD31 estuvo disminuida en pacientes de tercera edad comparados con los de mediana edad (Figura 15A).

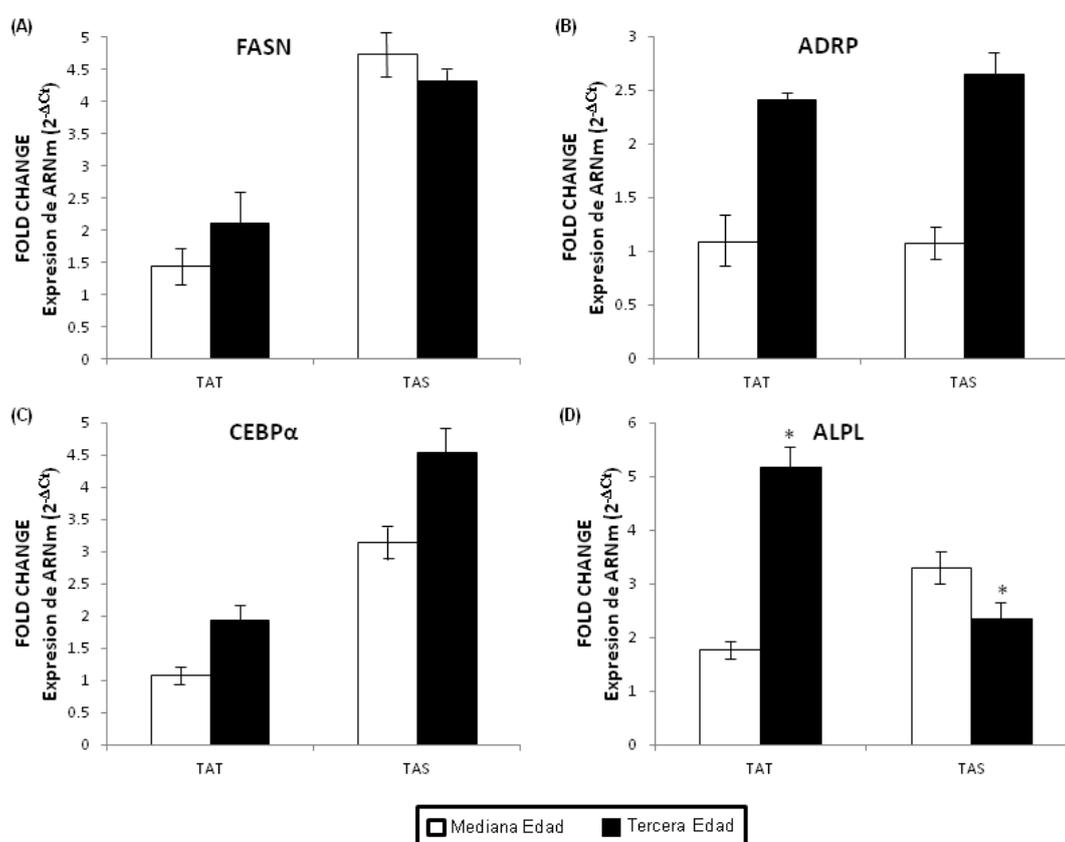


Figura 14. Incrementos de la expresión génica del ARNm de los marcadores adipogénicos FASN, ADRP y CEBP α y del marcador osteogénico ALPL de TAT y TAS de sujetos de mediana y tercera edad con cardiomiopatía isquémica. El análisis de la expresión del ARNm de FASN, ADRP y CEBP α (A-C) y de ALPL (D) fue realizado en el TAT y TAS de los dos grupos de sujetos con cardiomiopatía estudiados (mediana edad, 45-65 años, n=8 y tercera edad, >70 años, n=18). Los niveles de ARNm fueron normalizados con los valores de la ciclofilina. Los resultados se obtuvieron por triplicado y se calculó su valor medio y error estándar. El Fold change se expresó según la relación “expresión génica en pocillo de diferenciación / expresión génica en pocillo control”, siendo la expresión en los controles igual a la unidad (no mostrada en la figura). Las barras de la figura representan el incremento que se produce en la expresión génica respecto al control. La relación entre ambos grupos de pacientes se analizó mediante test U de Mann-Whitney. * $p < 0.05$.

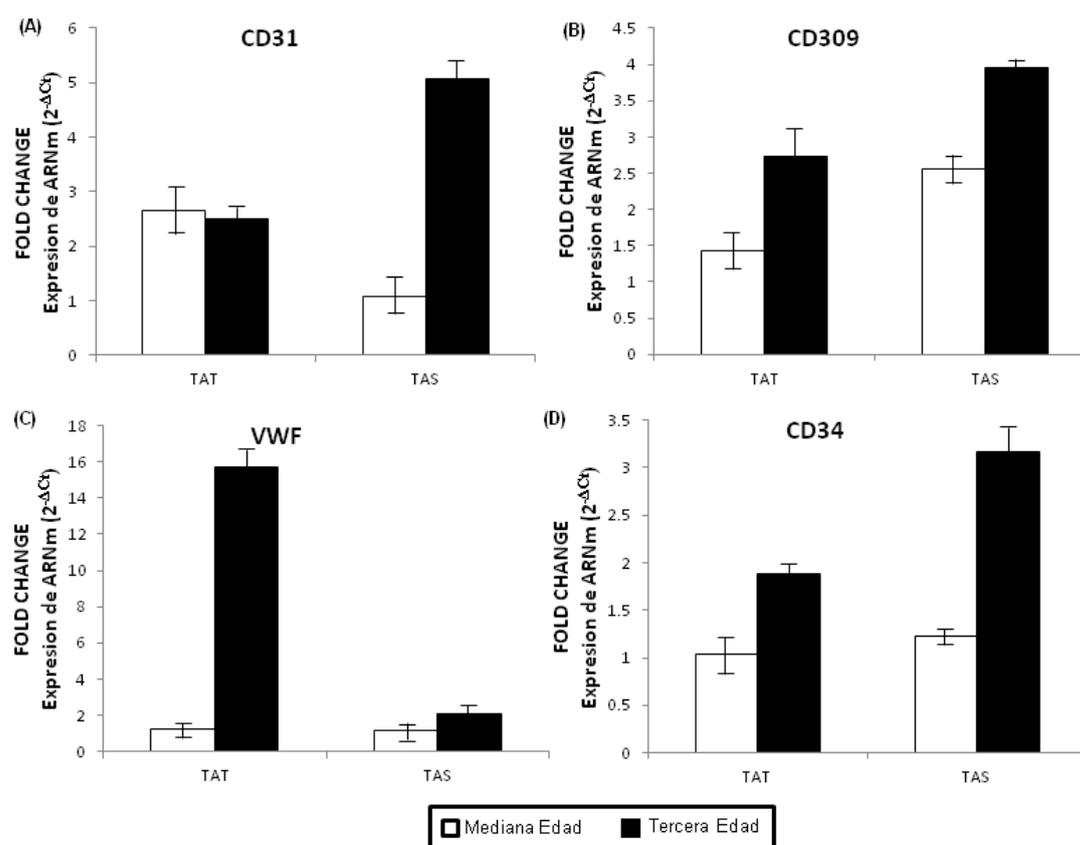


Figura 15. Incrementos de la expresión génica del ARNm de los marcadores endoteliales CD31, CD309, VWF y CD34 de TAT y TAS de sujetos de mediana y tercera edad con cardiomiopatía isquémica. El análisis de la expresión del ARNm de CD31, CD309, VWF y CD34 (A-D) fue realizado en el TAT y TAS de los dos grupos de sujetos con cardiomiopatía estudiados (mediana edad, 45-65 años, n=5 y tercera edad, >70 años, n=8). Los niveles de ARNm fueron normalizados con los valores de la ciclofilina. Los resultados se obtuvieron por triplicado y se calculó su valor medio y error estándar. El Fold change se expresó según la relación “expresión génica en pocillo de diferenciación / expresión génica en pocillo control”, siendo la expresión en los controles igual a la unidad (no mostrada en la figura). Las barras de la figura representan el incremento que se produce en la expresión génica respecto al control. La relación entre ambos grupos de pacientes se analizó mediante test U de Mann-Whitney.

Formación de túbulos por células endoteliales procedentes de la vena safena humana (HSaVEC) en medio condicionado generado por cultivo de células procedentes de la SVF derivadas de TAT y TAS.

Angiogénesis conlleva degradación de la membrana basal proliferación y migración de células endoteliales a la matriz intracelular, seguido de alineamiento y reorganización de las células endoteliales en una estructura tubular y formación de una nueva membrana basal. El paso de formación de la estructura tubular tridimensional por parte de las células endoteliales es clave para el ensayo de la eficacia de agentes como elementos pro-/anti-angiogénicos. Para profundizar en la implicación del TA sobre la angiogénesis cuantificamos la formación de túbulos por parte de células endoteliales HSaVEC cultivadas con medios condicionados obtenidos a partir de cultivo de células de la SVF derivadas de TAT y TAS en matrigel como ensayo *in vitro* del potencial angiogénico. Los medios condicionados promueven la migración de las células endoteliales HSaVEC y su diferenciación hacia estructuras tubulares. El cultivo de células HSaVEC en medio condicionado dio lugar a la formación de túbulos que se pudieron visualizar mediante microscopio fluorescente de contraste de fases. Ejemplos de las estructuras formadas se muestran en la figura 16. Tras su observación, se realizó cuantificación de las estructuras tubulares, considerando como túbulos aquellas estructuras cuya longitud superara cuatro veces su ancho. Los valores medios de esta medida se muestran en la tabla 9. No existieron diferencias significativas en la longitud de túbulos formados en ambos tejidos adiposos, sin embargo, se aprecia una tendencia opuesta al aumentar la longitud de éstos con la edad para el caso del TAT y comportarse de manera contraria en el caso del TAS.

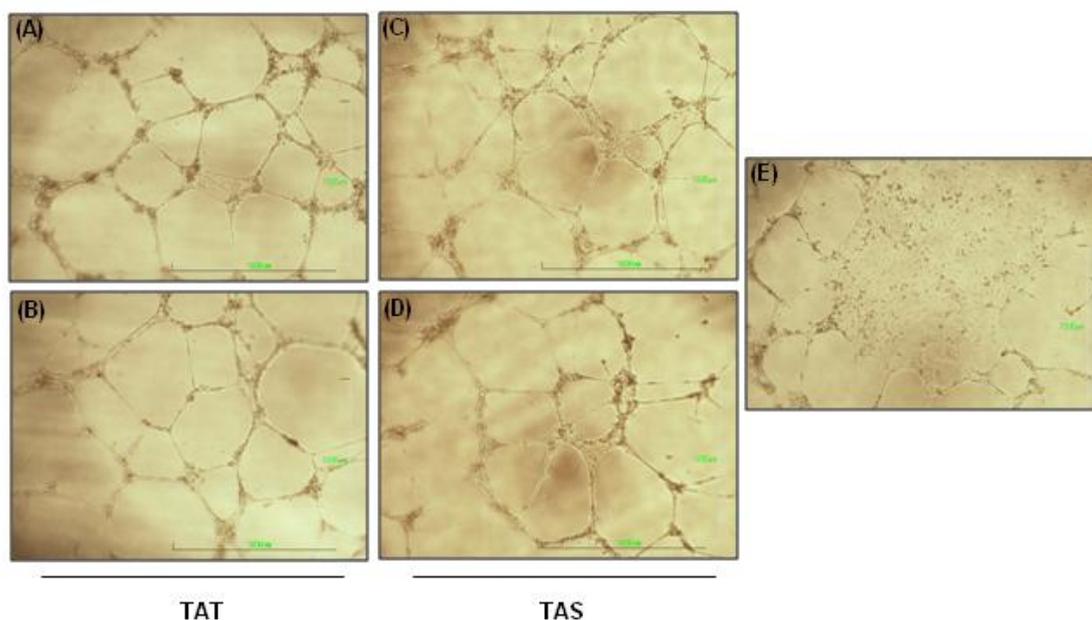


Figura 16. Imágenes representativas de la formación de túbulos endoteliales en medios condicionados procedentes del cultivo de la SVF de TAT y TAS de pacientes de mediana y tercera edad con cardiopatía isquémica. Se realizaron ensayos *in vitro* de formación de túbulos endoteliales sembrándose células HSaVEC en medio condicionado (generado en hipoxia) sobre matrigel reducido en factores de crecimiento durante 24 horas bajo condiciones estándar de cultivo. En la cuantificación de tubos se consideraron túbulos aquellas estructuras cuya longitud superó cuatro veces el ancho. A y C, los medios condicionados fueron generados a partir de células de pacientes de mediana edad. B y D, los medios condicionados fueron generados a partir de células de pacientes de tercera edad. E, aspecto de las células HSaVEC antes de su reorganización hacia estructuras tubulares.

	Mediana Edad (N=12)	Tercera Edad (N=8)
TAT	9.969 ± 0.415	10.374 ± 0.531
TAS	10.310 ± 0.412	9.788 ± 0.290

Tabla 9. Cuantificación de las estructuras tubulares formadas por células endoteliales HSaVEC en medio condicionado generado tras cultivo de células procedentes de la SVF derivadas de TAT y TAS de pacientes de mediana y tercera edad con cardiopatía isquémica. Los valores presentados en la tabla expresan la media (pacientes de mediana edad, 45-65 años, n=12 y pacientes de tercera edad, >70 años, n=8) ± error estándar. La relación entre ambos tejidos adiposos se analizó mediante test U de Mann-Whitney.

Análisis de correlación.

El análisis de correlación de la edad de los pacientes con cardiomiopatía isquémica y la expresión génica de los marcadores adipogénicos y de diferenciación endotelial en el TAT y TAS no mostró correlación entre estos parámetros (datos no mostrados). Sin embargo, el análisis de correlación de la edad de los pacientes con cardiomiopatía isquémica y la expresión génica del marcador osteogénico fosfatasa alcalina -ALPL- en el TAT y TAS mostró una significativa correlación positiva entre estos parámetros (Tabla 10). En el resto de parámetros osteogénicos no se encontró correlación con la edad (datos no mostrados).

	Edad (<i>r</i>)
ALPL TAT	0.442*
ALPL TAS	0.734**

Tabla 10. Análisis de correlación entre la expresión del marcador osteogénico ALPL y la edad en el TAT y TAS de pacientes con cardiomiopatía isquémica. Las correlaciones fueron determinadas mediante test de correlación de Spearman. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

DISCUSIÓN

Actualmente, el tejido adiposo subcutáneo y el visceral son las dos fuentes de factores angiogénicos más apropiadas disponibles (Rehman J. y col.; 2004) y unos perfectos candidatos para su uso en ingeniería genética y neovascularización (Kondo K. y col.; 2009). Sin embargo, muchos investigadores están indicando recientemente que el envejecimiento disminuye las propiedades angiogénicas de estos tejidos adiposos (El-Ftesi S. y col.; 2009. Efimenko A. y col.; 2011). Aún así, y debido a que resultan de fácil acceso, estos tejidos adiposos permanecen como la principal fuente disponible de factores angiogénicos y de células progenitoras con potencial de mejorar la neovascularización de los tejidos isquémicos (Efimenko A. y col.; 2011).

En este trabajo, y por primera vez, mostramos una nueva fuente de tejido adiposo y factores angiogénicos que resulta atractiva: el tejido adiposo adulto de timo, en el cual no parece que sus propiedades angiogénicas se alteren con el envejecimiento sino que, por el contrario, estas características están significativamente incrementadas con el aumento de la edad.

Según nuestro conocimiento, este es el primer trabajo que muestra que en los sujetos de edad avanzada (tercera edad) con cardiomiopatía isquémica, mientras que los niveles de expresión génica de los marcadores angiogénicos y endoteliales disminuyeron en el tejido adiposo subcutáneo, el tejido adiposo de timo mostró un incremento en la expresión génica de estos parámetros en comparación con los de mediana edad. Así mismo, la expresión génica de los marcadores adipogénicos mostró un incremento en el TAT de sujetos de tercera edad comparados con los de mediana edad, mientras que en el TAS

mostraron un descenso. Además, en el TAT, los niveles de expresión de CD31, VEGF-A, VEGF-C, VEGF-R1 y VEGF-R2 correlacionaron significativa y positivamente con la edad con independencia de cualquier otra covariante clínica confundente, entre las que se incluyen IMC, glucosa, colesterol y triglicéridos. De manera interesada, las asociaciones de VEGF-D y VEGF-R3 con la edad fueron eliminadas cuando controlamos el IMC, la glucosa, el colesterol y los triglicéridos, sugiriendo que estos parámetros clínicos tienen efectos que confunden en los parámetros linfangiogénicos, mientras que los factores angiogénicos parecen ser independientes de estas covariantes clínicas en el TAT de estos pacientes. Por otro lado, en el tejido adiposo subcutáneo, las correlaciones entre estos marcadores angiogénicos y la edad fueron negativas. Estos últimos resultados confirman los datos previos que muestran que el envejecimiento disminuye la angiogénesis y reduce los niveles de expresión de diversos factores angiogénicos (El-Ftesi S. y col.; 2009. Efimenko A, y col.; 2011. Arthur W.T. y col.; 1998). De hecho, se ha mostrado que la función angiogénica del tejido adiposo está dañada en sujetos de tercera edad, sugiriendo que este declive puede limitar el uso del tejido adiposo como una fuente de células progenitoras endoteliales autólogas, potencialmente utilizables para la reparación cardiovascular en pacientes de tercera edad (Madonna R. y col.; 2011). Otros estudios llevados a cabo en roedores han mostrado que las células madre de tejido adiposo de ratón adulto manifestaron un descenso de las propiedades angiogénicas en comparación con las células madre del tejido adiposo de ratones jóvenes (Efimenko A. y col.; 2011).

Recientemente nuestro grupo mostró que las isoformas del VEGF más expresadas en el TAT son VEGF-A y VEGF-B en comparación con las otras isoformas de este factor angiogénico (VEGF-C, VEGF-D, etc.) (Tinahones F. y col.; 2009). Estos factores angiogénicos son reguladores clave de la angiogénesis y la vasculogénesis (Oosthuysen B. y col.; 2001. Carmeliet P. y col.; 1996). En el presente estudio, observamos que en el TAT, a pesar de tener menores niveles de expresión de VEGF-A y VEGF-B en sujetos de mediana edad en comparación con el TAS, se produce un incremento significativo de estos dos factores angiogénicos para el caso de sujetos de tercera edad mientras que en el TAS estos factores mostraron un claro y significativo descenso. Por otra parte, mientras que en el TAS los niveles de expresión de VEGF-C y VEGF-D no mostraron ninguna diferencia de expresión en relación con el envejecimiento, el TAT puso de manifiesto un claro incremento de expresión en sujetos de tercera edad comparados con los de mediana edad. Ambas isoformas son conocidas por jugar un papel fundamental en la elevación de la linfangiogénesis (Karkkainen M.J. y col.; 2004. Stacker SA. y col.; 2001). Además, cuando analizamos la expresión génica de los marcadores endoteliales se observaron perfiles similares a los encontrados en los factores angiogénicos, mostrando un perceptible y significativo incremento de estos parámetros en el TAT de los sujetos de tercera edad, mientras que en el TAS estos niveles se encontraron drásticamente disminuidos. Adicionalmente, la mayoría de los niveles de expresión génica de los marcadores angiogénicos y endoteliales mostraron una significativa correlación positiva con la edad en el TAT. Todos estos datos juntos indican claramente que en los sujetos de edad avanzada el tejido adiposo de timo constituye una

atractiva y prometedora fuente de actividad angiogénica en comparación con el tejido adiposo subcutáneo.

En realidad, la involución que se produce en el timo humano adulto con la edad podría consistir en el reemplazamiento de su composición inmunogénica por tejido adiposo. Este hecho es evidentemente apreciado por el incremento de masa adiposa de timo durante la vida. Esta consideración puede ser corroborada aquí a través del análisis de los factores adipogénicos, los cuales mostraron un significativo incremento de la expresión génica y proteica de sus parámetros en el TAT de los sujetos de tercera edad, mientras que en el TAS estos marcadores mostraron una significativa disminución, permaneciendo en niveles menores a aquéllos detectados en el TAT de dichos sujetos de tercera edad. Además, el hecho de que los factores angiogénicos mostraran una fuerte correlación positiva significativa con los marcadores adipogénicos, nos permite creer que el incremento de las propiedades angiogénicas puede ser debido al incremento que se produce en la masa de tejido adiposo durante la vida, y, como es bien conocido, la angiogénesis está ligada a la adipogénesis (Cao Y. y col.; 2007).

Diversos estudios han analizado la capacidad de extractos de tejido adiposo humano maduro para inducir angiogénesis y adipogénesis *in vitro*; dichos extractos contienen numerosos factores angiogénicos y adipogénicos como VEGF, Leptina, IGF-1, así como una amplia variedad de citoquinas, situando al tejido adiposo como un agente a considerar en la inducción de angiogénesis de los procesos de vascularización requeridos para la aplicación

de ingeniería de tejidos, *in vitro* e *in vivo* (Sarkanen J.R. y col.; 2012). En nuestros análisis *in vivo* los fragmentos de grasa implantados sobre la membrana corioalantoidea -CAM- de embriones de codorniz estimularon la formación de vasos sanguíneos en las proximidades del punto de inserción del tejido mostrando que la capacidad de inducción angiogénica del TAT fue mayor que la del TAS, sin diferencias en cuanto a la edad del tejido insertado. Se pone de relieve, por tanto, que el TAT constituye una potente fuente de actividad angiogénica en comparación con el TAS que no ve alterada sus características en función de la edad del paciente donador. Estos resultados evidencian los estudios que han mostrado las cualidades angiogénicas del tejido adiposo en diversas áreas del organismo (Zuk P.A. y col.; 2002. Salas J. y col.; 1990. Valina C. y col.; 2007), así como ponen de manifiesto que el Tejido Adiposo de Timo también presenta dicha funcionalidad angiogénica, incluso mejorada en comparación con el TAS ya que tratándose del mismo paciente donador el TAT estimula mayor formación de vasos sanguíneos en las proximidades de su punto de inserción que el TAS, y lejos de comportarse como un tejido degenerado actúa como potencial fuente angiogénica, al igual que ya lo hacen los comunes tejidos adiposos utilizados. Estudios previos de nuestro grupo de investigación ya informaron sobre la producción de una gran variedad de factores angiogénicos en la grasa de timo adulto tales como VEGF-A, VEGF-B, Ang1 y Tie-2 (Salas J. y col.; 2009). VEGF-A y VEGF-B, dos factores fundamentales para la vasculogénesis, se expresan en niveles similares tanto en TAT como en el TAS (Salas J. y col.; 2009), grasa blanca conocida por mostrar elevados niveles de VEGF (Hausman G.J. y col.; 2004). Ang1, por su parte, es conocido por promover la angiogénesis y la

remodelación vascular (Klagsbrun M. y col.; 1996). Apoyando los datos sobre la presencia de diversos factores angiogénicos en la grasa de timo e indicando su capacidad angiogénica encontramos un análisis sobre el papel fisiológico que la grasa de timo podría desempeñar en los procesos de angiogénesis de las células endoteliales de cordón endotelial humano (HUVEC); dichas células, cultivadas en presencia de extractos de grasa tímica mostraron una potenciada respuesta proliferativa y migratoria (Salas J. y col.; 2009), dos pasos importantes en la cascada de eventos angiogénica (Hausman G.J. y col.; 2004). Todos estos resultados se ven avalados por los actualmente obtenidos *in vivo* mediante implantación de fragmentos de TA sobre la CAM de embriones de codorniz, sugiriendo que la grasa de timo podría desempeñar un relevante papel en la promoción de dos procesos fundamentales para la ingeniería tisular como son la vasculogénesis y la angiogénesis, independientemente de ver afectadas su capacidades por el incremento de la edad.

Las tendencias actuales en ingeniería de tejidos consisten en el empleo de células madre aisladas de tejidos adultos (Eberli D. y col.; 2006). El estudio de las células madre abrió un extenso campo en el área biomédica desde su descubrimiento (primeras células madre embrionarias de procedencia humana -Thomson J.A. y col.; 1998-) ya que combinan facilidad de obtención con viabilidad para expansión en cultivos *in vitro*, convirtiéndolas en unas estupendas candidatas para su investigación como herramienta terapéutica en el área de regeneración tisular e ingeniería de tejidos. Con la finalidad de contribuir al conocimiento sobre las células madre y sus posibles aplicaciones

en biomedicina, el propósito de la segunda parte de nuestro estudio se basó en aislar, caracterizar e inducir la diferenciación celular *in vitro* de las células madre mesenquimales derivadas de la fracción del estroma vascular (SVF) del tejido adiposo de tимо, en comparación con el tejido adiposo subcutáneo, procedentes de pacientes de mediana y tercera edad con cardiomiopatía isquémica sometidos a cirugía cardiovascular por necesidad de un bypass cardiovascular.

Los resultados obtenidos tras nuestros ensayos indican que a partir de las muestras de Tejido Adiposo, tanto de tимо como subcutáneo, es posible aislar células o colonias individuales mediante métodos de digestión enzimática y tras 14 días de cultivo; además las células que contienen nuestros tejidos en estudio son células adherentes con morfología fibroblastoide lo cual concuerda con los resultados de otros estudios donde las células fibroblastoides derivadas de tejido adiposo forman una monocapa desde los 5-10 días tras su cultivo inicial (Kern S. y col.; 2006). Estas células fibroblastoides adherentes pueden ser expandidas en cultivo para posteriormente cumplir los criterios establecidos por la Sociedad Internacional de Terapia Celular (*ISCT, Internacional Society Cellular Therapy*) (Dominici M. y col.; 2006).

Todas las muestras pertenecientes al mismo tipo de tejido adiposo presentaron un patrón de crecimiento y expansión común de los cultivos celulares, no observándose signos de senescencia obvia como cabía esperar ya que las células madre adultas derivadas de tejido adiposo pueden ser expandidas en cultivo sin senescencia durante más de 20 ciclos de doblaje

poblacional (Cao Y. y col.; 2005). El perfil de las curvas de proliferación celular de ambos tipos de tejidos fue bastante similar, aunque observamos diferencias respecto al tiempo de doblaje poblacional. Si bien el tiempo necesario para que la población celular procedente de la SVF del tejido adiposo subcutáneo en pase tres duplicara su número de células fue menor que en el caso de células procedentes de tejido adiposo de tamo, no existieron diferencias significativas entre ambos valores, por lo que podemos decir que ambos tiempos son equiparables. Análisis actuales sobre la capacidad de proliferación de células madre mesenquimales derivadas de médula ósea, cordón umbilical y tejido adiposo pusieron de manifiesto que las células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo poseen el menor tiempo de doblaje poblacional de las tres fuentes testadas, no afectando ello a sus características o potencialidad como células madre (Kern S. y col.; 2006), por lo que extrapolamos que el menor tiempo de doblaje poblacional encontrado para las células derivadas del TAT no interfiere en sus características como células madre mesenquimales. Estudios recientes indican que existe un efecto de la edad del paciente la cual afecta al crecimiento de las células madre derivadas de tejido adiposo, encontrándose diferencias significativas en el doblaje poblacional de células obtenidas a partir de donantes jóvenes o de edad avanzada (Choudhery M.S. y col.; 2014), por lo que un aspecto a considerar sería la realización de un estudio más exhaustivo en esta dirección, comprobando si en el TAT se ve disminuido el doblaje de la población de células madre mesenquimales con el aumento de la edad. Quizás resulte algo especulativo pero pensamos que este efecto de la edad del paciente sobre el crecimiento de las células madre derivadas de tejido adiposo no va a ponerse de manifiesto en el TAT ya que el

rango de edad analizado por Choudhery M.S. y col. es de pacientes de 18-39 años, de 40-49 años y de edad superior a 50 años, mientras que la media de edad de nuestros sujetos de estudio es de 70 años por lo que la curva de doblaje poblacional obtenida en nuestros análisis debería haber sido muy baja o casi inexistente pues apenas se produciría duplicación del número de células al encontrarnos en una edad muy avanzada. Lejos de no apreciar doblaje poblacional y a pesar de la avanzada edad de los donantes analizados, las células madre mesenquimales derivadas del TAT presentan una cinética de crecimiento celular normal y equiparable al de células madre mesenquimales obtenidas a partir de otras localizaciones, por lo que el uso de este novedoso tejido adiposo como fuente de células madre mesenquimales para uso en terapia celular y medicina regenerativa es totalmente factible, al igual que ya se hace con células madre mesenquimales derivadas de otros tejidos (Socarrás-Ferrer B.B.; 2013), e independiente de la edad.

La inmunofenotipación de las células madre mesenquimales de nuestro estudio cumplió con el criterio establecido por la ISCT (Dominici M. y col.; 2006). Según criterio de la ISCT más del 95% de la población de células madre mesenquimales deben presentar los antígenos de superficie CD105, CD73 y CD90. Mientras que esto se cumple para CD73 y CD90, CD105 se muestra en un porcentaje inferior a dicho nivel en células derivadas de ambos TA. La expresión de CD105 puede aumentar o disminuir de acuerdo a los niveles de TGF- β presentes en el medio y las células madre mesenquimales pueden producir esta citoquina en cultivo (Popova A.P. y col.; 2010), por lo que es posible que la actividad autocrina de las células madre mesenquimales haya

influido en la expresión de dicho antígeno de superficie. Otros marcadores de superficie celular frecuentemente usados para caracterizar colonias de células madre mesenquimales derivadas de Tejido Adiposo han sido CD29 y CD44 (Zuk P.A. y col.; 2002), así como CD146, CD166, CD106 (VCAM1) y CD49D (ITGA4) (Gronthos S. y col.; 2001). Para ayudar a confirmar que las células aisladas en nuestro estudio son células progenitoras analizamos estos marcadores y encontramos que todos ellos se manifiestan en un porcentaje considerable de células para ambos tejidos adiposos, con la salvedad de CD146 el cual también se ha descrito que su expresión desciende con los sucesivos pases de cultivo hasta que finalmente se pierde casi por completo (Mitchell J.B. y col.; 2006). Por tanto, la población de células aisladas en nuestros análisis a partir de ambos tejidos adiposos, además de los marcadores específicos de células madre mesenquimales, manifiestan las proteínas de superficie esperadas para células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo. CD31 y CD144 son dos marcadores típicos de células endoteliales que diversos grupos han usado para caracterizar y definir células progenitoras endoteliales dentro de la población celular derivada de tejido adiposo (Miranville A. y col.; 2004), por lo que la baja expresión encontrada en la población celular de nuestro estudio concuerda con lo descrito en la bibliografía, ratificando con otros dos marcadores adicionales la riqueza de nuestros cultivos en células madre derivadas de tejido adiposo. Las células madre mesenquimales expresan abundantes receptores del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFRs: platelet-derived growth factor receptor, PDGFR α o CD140A y PDGFR β o CD140B), los cuales juegan un papel crucial en especificar su compromiso hacia destino y potencial

osteogénico, condrogénico o adipogénico (Ball S.G. y col.; 2012); estos factores de crecimiento son mitógenos para células de origen mesenquimal y se encargan de promover el desarrollo embrionario, la proliferación, supervivencia, diferenciación y migración celular entre otros procesos. En nuestra población celular sí que encontramos un porcentaje elevado del marcador PDGFR β o CD140B en células madre aisladas de ambos tejidos adiposos, sin embargo, PDGFR α o CD140A sólo se encuentra en un 3% del total celular, al igual que se ha descrito que ocurre en células humanas fetales derivadas de médula ósea, donde las células PDGFR α ⁺ sólo representan un pequeño subconjunto de las células que también se muestran como CD146⁺ (Pinho S. y col.; 2013).

CD133 consiste en un marcador de células precursoras endoteliales cuya expresión se ha encontrado disminuida en células madre mesenquimales derivadas de médula ósea, cordón umbilical y tejido adiposo (Kern S. y col.; 2006). En las células derivadas del TAS de los pacientes de nuestro estudio la expresión de CD133 presenta valores muy bajos mientras que el porcentaje de células CD133⁺ detectado en el TAT es significativamente elevado en comparación con el TAS. Por su parte, CD34 es un típico marcador endotelial (Müller A.M. y col.; 2002) cuya expresión debe aparecer ausente en las poblaciones de células madre mesenquimales (Dominici M. y col.; 2006), lo cual se verifica para las células madre mesenquimales aisladas a partir del TAS de nuestros sujetos de estudio pero no para las aisladas a partir del TAT, donde el porcentaje celular encontrado resultó significativamente mayor en comparación con el TAS. CD14 se expresa en monocitos y macrófagos y en

bajos niveles en neutrófilos y eosinófilos (Sabroe I. y col.; 2002) y según criterio de la ISCT debe aparecer en niveles bajos en las poblaciones de células madre mesenquimales (Dominici M. y col.; 2006). Al igual que lo observado para los dos marcadores anteriores (CD133 y CD34), el porcentaje celular CD14+ encontrado en nuestra población celular derivada de TAT presenta altos niveles significativos de este marcador en comparación con el bajo nivel detectado para el TAS, el cual coincide con lo descrito en la bibliografía. Las células progenitoras endoteliales han sido caracterizadas por la expresión de CD34, CD133 y VEGFR-2 (Gehling U.M. y col.; 2000. Peichev M. y col.; 2000) y se ha demostrado que participan en los procesos de vasculogénesis y angiogénesis, dos procesos importantes para la reparación y mantenimiento vascular (Carmeliet P. y col.; 2001). Concretamente, los progenitores endoteliales contribuyen a la formación de los vasos sanguíneos adultos estando involucrados en la neovascularización tras eventos de isquemia y participando en la homeostasis vascular (Takahashi T. y col.; 1999. Crosby J.R. y col.; 2000), y hay estudios que demuestran que las células sanguíneas CD133+, CD34+ y VEGFR-2 constituyen una fuente celular para la neovascularización de tejidos isquémicos. En la misma línea, se ha mostrado que tras cuatro días de cultivo la mayoría de células progenitoras endoteliales expresan fuertemente marcadores originales de monocitos y macrófagos como CD14, CD11b y CD11c (Rehman J. y col.; 2003) y, además, células progenitoras endoteliales aisladas tras 7 días de cultivo expresaron elevados niveles del marcador de monocitos CD14 (Gulati R. y col.; 2003). Por tanto, se ha encontrado que en la medula ósea y la sangre periférica de adultos existe un subtipo especial de células progenitoras que son capaces de diferenciarse en células endoteliales

maduras contribuyendo así en la endotelización y neovascularización (Hristov M. y col.; 2004); estas células tienen propiedades angiogénicas y presentan en superficie los marcadores CD133 y CD34, así como en estadíos tempranos de cultivo son positivas para CD14 (Hristov M. y col.; 2004). Todos estos datos nos sugieren que, mientras que en la población celular aislada a partir del TAS nos encontramos con la expresión del conjunto típico de proteínas de superficie celular que caracteriza a las células madre mesenquimales, careciendo de los marcadores de células hematopoyéticas y endoteliales, en el caso de la población celular aislada a partir del TAT estamos ante la posibilidad de encontrarnos con una población de células madre mesenquimales claramente caracterizada que, además, presenta marcadores propios de células progenitoras endoteliales lo cual las puede dotar de mayor predisposición para su diferenciación hacia células endoteliales y por tanto, las situaría en mejor posición que las células madre mesenquimales derivadas de otros tejidos adiposos para su utilización y aplicación en regeneración tisular e ingeniería de tejidos.

Las células madre mesenquimales se consideran células progenitoras que poseen la habilidad de diferenciarse hacia una variedad de tipos celulares específicos en respuesta a estímulos concretos de diferenciación (Brivanlou AH y col.; 2003). Las células estromales derivadas de tejido adiposo, ADSCs, poseen la capacidad de diferenciarse, *in vitro*, hacia células con linaje mesenquimal, incluyendo adipocitos, osteoblastos, condrocitos, cardiomiocitos, mioblastos y células endoteliales (Zuk P.A. y col.; 2002). Por tanto, ante el estímulo adecuado, podemos inducir la diferenciación de las células madre

mesenquimales hacia el tipo celular deseado del linaje mesenquimal bajo condiciones estándar de cultivo. Para confirmar esta característica realizamos una evaluación *in vitro* del potencial de diferenciación adipogénico y osteogénico. Tanto el análisis microscópico (evaluación cualitativa) como el genético (evaluación cuantitativa) de los ensayos de diferenciación realizados mostraron que las células de la SVF de TAT y TAS procedentes de nuestros sujetos en estudio, tras someterlas a inducción adipogénica y osteogénica, se diferenciaron de forma exitosa hacia adipocitos y osteocitos respectivamente, indicando que nuestras células ADSCs cumplen con el tercero de los criterios mínimos establecidos por la ISCT para la definición de células madre mesenquimales: inducción de diferenciación *in vitro* de las células madre mesenquimales bajo condiciones estándar de cultivo (Dominici M. y col.; 2006).

Por otro lado, se ha demostrado la diferenciación de células madre mesenquimales humanas adultas expandidas hacia células con fenotipo y características funcionales de células endoteliales (Oswald J. y col.; 2004). Para caracterizar el fenotipo de células madre mesenquimales diferenciadas hacia células endoteliales se mide el aumento de expresión génica de diversos marcadores endoteliales como vWF (von Willebrand factor), CD309/VEGFR-2/KDR (un marcador temprano para células progenitoras endoteliales - Miettinen M. y col.; 2012-) y CD31 (Janeczek Portalska K. y col.; 2012), así como CD34 (Pusztaszeri M.P. y col.; 2006). Con nuestra evaluación cuantitativa sobre la capacidad de diferenciación endotelial de las células madre mesenquimales aisladas a partir de los dos tejidos adiposos en estudio, TAT y TAS, mostramos que dichas células son capaces de diferenciarse *in vitro*

hacia células endoteliales, lo cual las convierte en unas atractivas candidatas a considerar en el desarrollo de vascularización en la ingeniería de vasos y tejidos, así como podrían ser útiles en el aumento del crecimiento de los vasos en tejidos isquémicos, como ya se están aplicando otras células progenitoras endoteliales (Oswald J. y col.; 2004).

De forma paralela a la caracterización de las células madre mesenquimales derivadas de la SVF de TAT y TAS se hizo una comparación de los niveles de expresión génica de los marcadores adipogénicos, osteogénicos y endoteliales en relación con la edad de los pacientes con cardiomiopatía isquémica (mediana y tercera edad). Mientras que en el TAT se produjo un notable incremento de los marcadores de diferenciación adipogénica, osteogénica y endotelial en los sujetos de tercera edad en comparación con los de mediana edad, en el TAS se apreció un incremento, no significativo, en la expresión de los parámetros de diferenciación endotelial, y en dos de los de diferenciación adipogénica, en los restantes así como en el marcador osteogénico hubo un descenso de la expresión con el aumento de la edad. Todos estos resultados van en consonancia con los obtenidos en la primera parte de nuestro estudio por lo que volvemos a ratificar al Tejido Adiposo de Timo como una atractiva y prometedora fuente de actividad angiogénica en comparación con el TAS, donde dicha función no parece estar afectada por el avance de la edad. Además, cuando se ha estudiado el efecto que tiene la edad de los pacientes donantes sobre el potencial de diferenciación osteogénico de sus células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo, se ha observado un descenso progresivo de la expresión de los

genes osteogénicos específicos conforme aumentó la edad del grupo de estudio (jóvenes, adultos y edad avanzada) (Choudhery M.S. y col.; 2014), como ocurre en nuestros análisis para el TAS, pero no para el TAT, lo cual nos hace pensar que el efecto de la edad no influye en el potencial de diferenciación que presenta el tejido adiposo tímico, mostrando una vez más que se trata de un tejido adiposo que no presenta las deficiencias que muestran los tejidos adiposos normalmente utilizados (El-Ftesi S. y col.; 2009). El incremento de todos los parámetros endoteliales en relación con la edad en ambos tejidos adiposos nos demuestra que el TAT, al igual que otro tejido adiposo común como es el TAS, puede ser considerado como fuente de células madre mesenquimales con capacidad de diferenciación hacia células endoteliales, unas células cada vez más demandadas en ingeniería de tejidos debido a la adecuada vascularización que deben presentar los “nuevos tejidos diseñados” (Janeczek Portalska K. y col.; 2012). Además, las células madre mesenquimales han mostrado capacidad para formar estructuras capilares en medio semisólido (Oswald J. y col.; 2004), y la presencia de suplementos de crecimiento resulta crucial para la estabilidad de dichos capilares formados in vitro (Janeczek Portalska K. y col.; 2012). En nuestros análisis, las células HSaVEC formaron túbulos con la misma eficiencia con independencia del medio condicionado en el que se encontrasen y la medida de la longitud total de los túbulos formados no mostró diferencias entre ellos, sin embargo la consideración de todos los datos analizados anteriormente y éstos nos hacen pensar que la ligera tendencia de aumento de longitud de vasos sanguíneos con el incremento de la edad que se aprecia en el caso del medio condicionado generado por células de la SVF de TAT, mientras que en TAS se aprecia una

tendencia de descenso, sea debida al efecto que la edad tiene sobre las células derivadas de tejido adiposo que no parece afectar al tejido adiposo tímico. Así, el TAT, se presentaría en este sentido como una mejor fuente alternativa de progenitores endoteliales respecto al TAS para usar en terapias clínicas de reemplazo o sustitución de tejidos o de vascularización de órganos artificiales, ya que no habría que considerar el factor “edad” a la hora de su utilización.

La medicina regenerativa y la ingeniería tisular tienen como objetivo mejorar la reparación tisular y para lograr regenerar tejidos combinando el estudio de factores de crecimiento, biomateriales y células madre mesenquimales (Butler D.L. y col.; 2000). Por definición, una célula madre se caracteriza por su habilidad para autorenovarse y diferenciarse hacia múltiples líneas celulares. Las alternativas de células madre disponibles son: células madre embrionarias (ESCs: Embryonic Stem Cells) y células madre adultas o células madre mesenquimales (MSCs: Mesenchymal Stem Cells, MSCs). Aunque el potencial terapéutico de la ESCs parece enorme debido a su gran capacidad de renovación y pluripotencialidad, hay limitaciones prácticas y éticas en su utilización, a diferencia de las células adultas que no poseen tales limitaciones y que es posible obtenerlas de diversos tejidos (Hass R. y col.; 2011). La medula ósea siempre ha sido considerada la principal fuente para el aislamiento de células madre mesenquimales debido a la alta eficiencia que presenta su aislamiento así como a la demostración de su capacidad de diferenciación hacia diversos tipos de células de origen mesodérmico (da Silva Meirelles L. y col.; 2008), sin embargo, presenta limitaciones considerables; por

un lado, la toma de muestras para su posterior aislamiento es un procedimiento invasivo y molesto para el paciente y por otro, su eficacia clínica es variable y no está muy claro cómo el fenotipo que define a las células madre mesenquimales derivadas de médula ósea, así como las características del donante, afectan a sus propiedades funcionales (Siegel G. y col.; 2013). Por estos motivos se han buscado fuentes alternativas para la obtención de células madre mesenquimales como sangre de cordón umbilical, placenta, o tejido adiposo, entre otros (Kern S. y col.; 2008). El tejido adiposo está siendo cada vez más estudiado y más utilizado para la obtención de células madre mesenquimales, entre otros motivos, por la relativa facilidad para la obtención de muestras. Con la finalidad de realizar estudios funcionales relacionados con terapia celular e ingeniería tisular es necesario partir de poblaciones de células madre mesenquimales caracterizadas de modo correcto según las recomendaciones sugeridas por la ISCT. Mediante la realización de nuestro estudio hemos conseguido aislar células con morfología fibroblastoide de tipo adherente in vitro, se ha determinado la expresión de los antígenos CD105, CD73 y CD90, así como la ausencia de marcadores hematopoyéticos, y se ha inducido su diferenciación hacia osteoblastos y adipoblastos, criterios básicos para la caracterización in vitro de células madre mesenquimales. Por todo ello demostramos a través de este estudio que es viable obtener, expandir y diferenciar células madre mesenquimales procedentes de la fracción vascular estromal derivadas de tejido adiposo de tamo, así como de subcutáneo, cumpliendo con los criterios establecidos por la ISCT para las células madre mesenquimales. Además, las células madre mesenquimales procedentes de la SVF del TAT presentan ciertas ventajas que las sitúan en una posición más

privilegiada respecto a las células madre mesenquimales derivadas de otros tejidos adiposos debido a que no parecen verse alteradas por el incremento de la edad y a que expresan marcadores propios de células progenitoras endoteliales lo que las dotaría de una mayor predisposición y más adecuada aplicación para la revascularización de tejidos isquémicos en ingeniería tisular.

Finalmente, uno puede asombrarse sobre el hecho de que el tejido adiposo de timo pueda resultar de interés como fuente de factores angiogénicos y de células madre mesenquimales, a la vista del fácil acceso que tienen los restantes tejidos adiposos corporales, tal como es el caso del tejido adiposo subcutáneo, e incluso el visceral. Como hemos mencionado anteriormente, tanto la enfermedad cardiovascular como la edad incrementan el daño de las propiedades angiogénicas que posee el tejido adiposo (El-Ftesi S. y col.; 2009), así como la edad del donante incide negativamente en la expansión y diferenciación de células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo (Choudhery M.S. y col.; 2014), incluyendo al tejido adiposo subcutáneo y al visceral, lo cual los convierte en candidatos insuficientes para las terapias angiogénicas y de neovascularización de tejidos isquémicos, por lo que la grasa de timo puede ser una atractiva y prometedora candidata para estas terapias. Parte del tejido usado es desechado en los procedimientos de canulación aórtica de la aorta ascendente durante la cirugía cardiovascular de pacientes con necesidad de un CPB (Rathore K.S. y col.; 2009. Pacifico A.D. y col.; 1986). No obstante, deben considerarse los posibles efectos adversos de la eliminación de esta grasa. En la experiencia clínica no nos informan de

complicaciones quirúrgicas o morbilidades asociadas a este procedimiento y la técnica utilizada es frecuentemente empleada por los cirujanos cardíacos (Rathore K.S. y col.; 2009. Pacifico A.D. y col.; 1986). No obstante, últimamente se están utilizando técnicas de cirugía no invasiva para abordar el tórax que facilitan el acceso a esta grasa por incisiones mínimas y sin necesidad de recurrir a intervenciones mayores o complejas cirugías (cirugía toracoscópica). Además, los estudios realizados sobre la grasa de timo y la función tímica se basan, en la mayoría de los casos, en la escisión y eliminación de la grasa de timo durante las intervenciones cardíacas, mostrando, por tanto, la frecuencia y seguridad de esta práctica. Por otro lado, la edad máxima a la que el timo todavía parece mostrar su función inmunológica residual es a los 49 años (Douek D.C. y col.; 2000. Flores K.G. y col.; 1999. Bertho J.M. y col.; 1997) y obsérvese que la principal fuente para obtención de tejido adiposo de timo son los pacientes isquémicos, los cuales se encuentran en su gran mayoría alrededor de los 60-70 años de edad (edad media de los donantes), por lo que su eliminación total o parcial no interfiere en la funcionalidad glandular.

Los resultados obtenidos en trabajos previos respecto a los considerables niveles de factores angiogénicos expresados en el TAT (Salas J. y col.; 2009) indican que dicho tejido merece ser estudiado en profundidad con el fin de investigar y promocionar su potencial utilidad como un nuevo tejido adiposo. Además, tomando en conjunto todos los datos obtenidos en nuestros estudios y dándoles una explicación, creemos que la grasa de timo está poco a poco cogiendo mayor interés como apropiada fuente de factores angiogénicos

frente a los restantes tejidos adiposos y, probablemente, como fuente de células progenitoras endoteliales, lo cual nos permite considerar muy interesante un profundo estudio de su potencial uso en la regeneración de nuevos vasos, especialmente en pacientes con cardiomiopatía isquémica. Estas consideraciones pueden parecer especulativas, pero tenemos la confianza de que en la exhaustiva caracterización de la población celular del estroma derivada del tejido adiposo de timo y de las células progenitoras endoteliales de este tejido adiposo, reside la habilidad de estas células endoteliales para mejorar la neovascularización pudiendo establecer si esta grasa desempeñaría con éxito un papel relevante en medicina regenerativa.

El mayor reto de la ingeniería tisular por el momento es la inducción de una adecuada vascularización. Numerosos métodos se han utilizado para ello, pero con resultados insatisfactorios (Lovett M. y col.; 2009). El Tejido Adiposo, órgano endocrino activo con densa vasculatura, secreta una amplia cantidad de factores angiogénicos y adipogénicos y parece constituir una atractiva fuente de dichos factores bioactivos muy a considerar para las aplicaciones de ingeniería tisular. Con los resultados de este trabajo se presenta una nueva fuente de tejido adiposo, de factores angiogénicos y de células madre mesenquimales con capacidad para diferenciarse en células endoteliales que puede ser de gran interés en estudios relacionados con tejido adiposo, angiogénesis y neovascularización de tejidos isquémicos. La glándula tímica puede perder su función inmunogénica con la vejez, pero creemos que esta funcionalidad se sustituye por otra función que merece consideración, a saber,

la de tejido adiposo. Aquí, hemos demostrado la funcionalidad angiogénica de esta nueva grasa así como su potencialidad como fuente de células madre mesenquimales y progenitoras endoteliales. Creemos que nuestro estudio abrirá nuevas líneas de investigación relacionadas con adipogénesis, expansión del tejido adiposo, angiogénesis y revascularización de tejidos isquémicos en medicina regenerativa e ingeniería tisular.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. En el TAT, los niveles de expresión génica de marcadores angiogénicos, adipogénicos y endoteliales se incrementan en sujetos de tercera edad comparados con sujetos de mediana edad, mientras que en el TAS estos parámetros decaen.
2. La expresión de CD31 y los VEGFs correlaciona significativa y positivamente con la edad en el TAT; esta correlación es negativa en el TAS.
3. La capacidad de inducción angiogénica mostrada por el TAT es mayor que la del TAS con independencia de la edad del tejido implantado, por lo que el TAT constituye una potente fuente de actividad angiogénica en comparación con el TAS que no ve alterada sus características en función de la edad del paciente donador.
4. A partir de Tejido Adiposo, tanto de tamo como subcutáneo, es posible aislar colonias individuales con células adherentes de morfología fibroblastoide que pueden ser expandidas en cultivo para cumplir los criterios establecidos por la Sociedad Internacional de Terapia Celular. Las células madre mesenquimales de nuestro estudio cumplieron con el criterio establecido por la ISCT y con otros aplicados para caracterizar colonias de células madre mesenquimales derivadas de Tejido Adiposo
5. Las células madre mesenquimales derivadas del TAT presentan una cinética de crecimiento celular normal y equiparable al de células madre

mesenquimales obtenidas a partir de otras fuentes, por lo que su doblaje poblacional no parece verse afectado por el efecto de la edad del paciente, y tienen la capacidad de diferenciarse hacia el linaje de adipocitos, osteocitos y células endoteliales.

6. Encontramos evidencias de presencia de marcadores de células progenitoras endoteliales en TAT lo que las puede dotar de mayor predisposición para su diferenciación hacia células endoteliales, situándolas en una posición privilegiada respecto a células madre mesenquimales derivadas de otros tejidos adiposos para su utilización y aplicación en regeneración tisular e ingeniería de tejidos.

7. La edad no afecta la capacidad de diferenciación de las células madre mesenquimales de TAT hacia adipocitos, osteocitos y células endoteliales por lo que el TAT no muestra las limitaciones que presentan los restantes tejidos adiposos respecto a su uso en función de la edad del paciente donador.

8. El tejido adiposo adulto de timo, cuyos marcadores adipogénicos, angiogénicos y endoteliales aumentan significativamente con el incremento de la edad, constituye una atractiva y prometedora fuente de factores angiogénicos y de células madre mesenquimales con capacidad para diferenciarse en células endoteliales, en comparación con el TAS, y es, probablemente, el candidato más adecuado para ser utilizado en terapia celular de sujetos con isquemia cardíaca.

BIBLIOGRAFÍA

1. **Abair T.D., Bulus N., Borza C., Sundaramoorthy M., Zent R., Pozzi A.** (2008). Functional analysis of the cytoplasmic domain of the integrin $\alpha 1$ subunit in endothelial cells. *Blood*, Oct, 15, 112(8):3242-54.
2. **Abbott B.D.** (2009). Review of the expression of peroxisome proliferator-activated receptors alpha (PPAR alpha), beta (PPAR beta), and gamma (PPAR gamma) in rodent and human development. *Reprod. Toxicol.*, 27(3-4):246-57.
3. **Antonson P., Xanthopoulos K.G.** (1995). Molecular cloning, sequence, and expression patterns of the human gene encoding CCAAT/enhancer binding protein alpha (C/EBP alpha). *Biochem Biophys Res Commun.*, 4, 215(1):106-13.
4. **Arthur W.T., Vernon R.B., Sage E.H., Reed M.J.** (1998). Growth factors reverse the impaired sprouting of microvessels from aged mice. *Microvasc Res.*, May, 55(3):260-70.
5. **Asano A., Morimatsu M., Nikami H., Yoshida T., Saito M.** (1997). Adrenergic activation of vascular endothelial growth factor mRNA expression in rat brown adipose tissue: Implication in cold-induced angiogenesis. *Biochem J.*, Nov, 15, 328(Pt1):179-83.
6. **Assmus B., Schächinger V. Teupe C., Britten M., Lehmann R., Döbert N., et al.** (2002). Transplantation of Progenitor Cells and Regeneration Enhancement in Acute Myocardial Infarction (TOPCARE-AMI). *Circulation*, 10, 106(24):3009-17.
7. **Azam F., Mehta S., Harris A.L.** (2010). Mechanisms of resistance to antiangiogenesis therapy. *Eur J Cancer.*, May, 46(8):1323-32.
8. **Baksh D., Davies J.E., Zandstra P.W.** (2003). Adult human bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells are capable of adhesion-independent survival and expansion. *Exp Hematol.*, Aug, 31(8):723-32.
9. **Ball S.G., Shuttleworth A., Kielty C.M.** (2012). Inhibition of platelet-derived growth factor receptor signaling regulates Oct4 and Nanog expression, cell shape, and mesenchymal stem cell potency. *Stem Cells*, Mar, 30(3):548-60.
10. **Bardot O., Aldridge T.C., Latruffe N., Green S.** (1993). PPAR-RXR heterodimer activates a peroxisome proliferator response element upstream of the bifunctional enzyme gene. *Biochem Biophys Res Commun.*, 15, 192(1):37-45.
11. **Bearzi C., Rota M., Hosoda T., Tillmanns J., Nascimbene A., De Angelis A., et al.** (2007). Human cardiac stem cells. *Proc Natl Acad Sci, USA*, Aug, 28, 104(35):14068-73.
12. **Bertho J.M., Demarquay C., Moulian N., Van Der Meer A., Berrih-Aknin S., Gourmelon P.** (1997). Phenotypic and immunohistological analyses of the human adult thymus: evidence for an active thymus during adult life. *Cell Immunol.*, Jul, 10, 179(1):30-40.
13. **Bouloumié A., Sengenès C., Portolan G., Galitzky J., Lafontan M.** (2001). Adipocyte produces matrix metalloproteinases 2 and 9: involvement in adipose differentiation. *Diabetes*, Sep, 50(9):2080-6.
14. **Bourin P., Bunnell B.A., Casteilla L., Dominici M., Katz A.J., March K.L., et al.** (2013). Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the International Federation for

- Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the International Society for Cellular Therapy (ISCT). *Cytotherapy*, Jun, 15(6):641-8.
15. **Bråkenhielm E., Cao R., Gao B., Angelin B., Cannon B., Parini P., et al.** (2004). Angiogenesis inhibitor, TNP-470, prevents diet-induced and genetic obesity in mice. *Circ Res*, Jun, 25, 94(12):1579-88.
 16. **Brasaemle D.L., Barber T., Wolins N.E., Serrero G., Blanchette-Mackie E.J., Londos C.** (1997). Adipose differentiation-related protein is an ubiquitously expressed lipid storage droplet-associated protein. *J Lipid Res*, Nov, 38(11):2249-63.
 17. **Brivanlou A.H., Gage F.H., Jaenisch R., Jessell T., Melton D., Rossant J.** (2003). Stem cells. Setting standards for human embryonic stem cells. *Science*, May, 9, 300(5621):913-6.
 18. **Butler D.L., Goldstein S.A., Guilak F.** (2000). Functional tissue engineering: the role of biomechanics. *J Biomech Eng*, Dec, 122(6):570-5.
 19. **Cai L., Johnstone B.H., Cook T.G., Tan J., Fishbein M.C., Chen P.S., et al.** (2009). Human adipose tissue-derived stem cells induce angiogenesis and nerve sprouting following myocardial infarction, in conjunction with potent preservation of cardiac function. *Stem Cells*, Jan, 27(1):230-7.
 20. **Cao Y.** (2005). Opinion: emerging mechanisms of tumour lymphangiogenesis and lymphatic metastasis. *Nat Rev Cancer*, Sep, 5(9):735-43.
 21. **Cao Y.** (2007). Angiogenesis modulates adipogenesis and obesity. *J Clin Invest*, Sep, 117(9):2362-8.
 22. **Cao Y., Sun Z., Liao L., Meng Y., Han Q., Zhao RC.** (2005). Human adipose tissue-derived stem cells differentiate into endothelial cells in vitro and improve postnatal neovascularization in vivo. *Biochem Biophys Res Commun*, Jul, 1, 332(2):370-9.
 23. **Cao Z., Umek R.M., McKnight S.L.** (1991). Regulated expression of three C/EBP Isoforms during adipose conversion of 3T3-L1 cells. *Genes Dev*, Sep, 5(9):1538-52.
 24. **Carmeliet P., Ferreira V., Breier G., Pollefeyt S., Kieckens L., Gertsenstein M.** (1996). Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature*, 380:435-439.
 25. **Carmeliet P., Luttun A.** (2001). The emerging role of the bone marrow-derived stem cells in (therapeutic) angiogenesis. *Thromb Haemost*, Jul, 86(1):289-97.
 26. **Caronia F., Fiorelli A., Monte A.L.** (2013). Bilateral thoracoscopic thymectomy using a novel positioning system. *Asian Cardiovasc Thorac Ann*, Nov, 12, pii:0218492313508563. [Epub ahead of print]
 27. **Caruso C., Buffa S., Cardore G., Colonna-Romano G., Dunn-Walters D., Kipling D., et al.** (2009). Mechanisms of immunosenescence. *Immun Ageing*, 6:10-4.
 28. **Castle S.C.** (2000). Impact of age-related immune dysfunction on risk of infections. *Z Gerontol Geriatr*, 33:341-349.
 29. **Cawthorn W.P., Scheller E.L., MacDougald O.A.** (2012). Adipose tissue stem cells meet preadipocyte commitment: going back to the future. *J Lipid Res*, Feb, 53(2):227-46.

30. **Chinen J., Finkelman F., Shearer W.T.** 2006. Advances in basic and clinical immunology. *J Allergy Clin Immunol.*, 118(2):489-495.
31. **Chmielewska-Kassassir M., Woźniak L.A., Ogrodniczek P., Wójcik M.** (2013). The role of peroxisome proliferator-activated receptors γ (PPAR γ) in obesity and insulin resistance. *Postepy Hig Med Dosw.*, Dec11,67(0):1283-99.
32. **Choudhery M.S., Badowski M., Muise A., Pierce J., Harris D.T.** (2014). Donor age negatively impacts adipose tissue-derived mesenchymal stem cell expansion and differentiation. *J Transl Med.*, Jan,7,12:8.
33. **Coe N.R., Bernlohr D.A.** (1998). Physiological properties and functions of intracellular fatty acid-binding proteins. *Biochim Biophys Acta*, 1391:287-306.
34. **Colter D.C., Class R., DiGirolamo C.M., Prockop D.J.** (2000). Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, Mar,28,97(7):3213-8.
35. **Cousin B., André M., Arnaud E., Pénicaud L., Casteilla L.** (2003). Reconstitution of lethally irradiated mice by cells isolated from adipose tissue. *Biochem Biophys Res Commun.*, Feb,21,301(4):1016-22.
36. **Crosby J.R., Kaminski W.E., Schatteman G., Martin P.J., Raines E.W., Seifert R.A., et al.** (2000). Endothelial cells of hematopoietic origin make a significant contribution to adult blood vessel formation. *Circ Res.*, Oct,27,87(9):728-30.
37. **da Silva Meirelles L., Caplan A.I., Nardi N.B.** (2008). In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells. *Stem Cells*, Sep,26(9):2287-99.
38. **de Carvalho M.H., Colaço A.L., Fortes Z.B.** (2006). Cytokines, endothelial dysfunction, and insulin resistance. *Arq Bras Endocrinol Metabol.*, Apr;50(2):304-12.
39. **de Schauwer C., Meyer E., Van de Walle G.R., Van Soom A.** (2011). Markers of stemness in equine mesenchymal stem cells: a plea for uniformity. *Theriogenology*, May,75(8):1431-43.
40. **Dobson D.E., Kambe A., Block E., Dion T., Lu H., Castellot J.J.Jr. et al.** (1990). 1-Butyryl-glycerol: a novel angiogenesis factor secreted by differentiating adipocytes *Cell.*, Apr,20,61(2):223-30.
41. **Dominici M., Le Blanc K., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F., Krause D., et al.** (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The international society for cellular therapy position statement. *Cytotherapy*, 8(4):315-7.
42. **Dorshkind K., Montecino-Rodriguez E., Signer R.A.** (2009). The ageing immune system: is it ever too old to become young again?. *Nat Rev Immunol*, 9(1):57-62.
43. **Douek D.C., Koup R.A.** (2000). Evidence for thymic function in the elderly. *Vaccine*, 18(16):1638-1641.
44. **Dowling M.R., Hodgkin P.D.** (2009). Why does the thymus involute? A selection-based hypothesis. *Trends Immunol.*, 30(7):295-300.
45. **Dvorak H.F., Nagy J.A., Feng D., Brown L.F., Dvorak A.M.** (1999). Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor and the significance of microvascular hyperpermeability in angiogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol.*, 237:97-132.

46. **Eberli D., Atala A.** (2006). Tissue engineering using adult stem cells. *Methods Enzymol.*,420:287-302.
47. **Edelberg J.M., Tang L., Hattori K., Lyden D., Rafii S.** (2002). Young adult bone marrow-derived endothelial precursor cells restore aging-impaired cardiac angiogenic function. *Circ Res.*,May,31,90(10):E89-93.
48. **Efimenko A., Dzhoyashvili N., Kalinina N., Kochegura T., Akchurin R., Tkachuk V., et al.** (2014). Adipose-derived mesenchymal stromal cells from aged patients with coronary artery disease keep mesenchymal stromal cell properties but exhibit characteristics of aging and have impaired angiogenic potential. *Stem Cells Transl Med.*,Jan,3(1):32-41.
49. **Efimenko A., Starostina E., Kalinina N., Stolzing A.** (2011). Angiogenic properties of aged adipose derived mesenchymal stem cells after hypoxic conditioning. *J Transl Med.*,Jan,18,9:10.
50. **El-Ftesi S., Chang E.I., Longaker M.T., Gurtner G.C.** (2009). Aging and diabetes impair the neovascular potential of adipose derived stromal cells. *Plast Reconstr Surg.*,Feb;123(2):475-85.
51. **Elmasri H., Karaaslan C., Teper Y., Ghelfi E., Weng M., Ince TA., et al.** (2009). Fatty acid binding protein 4 is a target of VEGF and a regulator of cell proliferation in endothelial cells. *Faseb J.*,Nov,23(11):3865-73.
52. **Fam N.P., Verma S., Kutryk M., Stewart D.J.** (2003). Clinician guide to angiogenesis. *Circulation*,Nov,25,108(21):2613-8.
53. **Ferrara N., Carver-Moore K., Chen H., Dowd M., Lu L., O'Shea K.S., et al.** (1996). Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature.*,Apr,4,380(6573):439-42.
54. **Ferrara N., Gerber H.P., LeCouter J.** (2003). The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med.*,Jun,9(6):669-76.
55. **Flores K.G., Li J., Sempowski G.D., Haynes B.F., Hale L.P.** (1999). Analysis of the human thymic perivascular space during aging. *J Clin Invest.*,Oct,104(8):1031-9.
56. **Fukuda S., Yoshii S., Kaga S., Matsumoto M., Kugiyama K., Maulik N.** (2004). Angiogenic strategy for human ischemia heart disease: Brief overview. *Mol Cell Biochem.*,Sep,264(1-2):143-9.
57. **Gao J., Serrero G.J.** (1999). Adipose differentiation related protein (ADRP) expressed in transfected COS-7 cells selectively stimulates long chain fatty acid uptake. *Biol Chem.*;Jun11,274(24):16825-30.
58. **Garin-Shkolnik T., Rudich A., Hotamisligil G.S., Rubinstein M.** (2014). FABP4 Attenuates PPAR γ and Adipogenesis, and is Inversely Correlated With PPAR γ in Adipose Tissues. *Diabetes.*,Mar,63(3):900-11.
59. **Gehling U.M., Ergün S., Schumacher U., Wagener C., Pantel K., Otte M., et al.** (2000). In vitro differentiation of endothelial cells from AC133-positive progenitor cells. *Blood*,May,15,95(10):3106-12.
60. **George A.J., Ritter M.A.** (1996). Thymic involution with ageing: obsolescence or good housekeeping?. *Immunol Today*,17(6):267-272.

61. **Gimble J., Guilak F.** (2003). Adipose-derived adult stem cells: isolation, characterization, and differentiation potential. *Cytotherapy*,5(5):362-9.
62. **Gimble J.M., Bunnell B.A., Chiu E.S., Guilak F.** (2011). Concise review: Adipose-derived stromal vascular fraction cells and stem cells: Let's not get lost in translation. *Stem Cells*,May,29(5):749-54.
63. **Gregoire F.M., Smas C.M., Sul H.S.** (1998). Understanding adipocyte differentiation. *Physiol Rev*,Jul,78(3):783-809.
64. **Gronthos S., Franklin D.M., Leddy H.A., Robey P.G., Storms R.W., Gimble J.M.** (2001). Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells. *J Cell Physiol*,Oct,189(1):54-63.
65. **Gruver A.L., Hudson L.L., Sempowski G.D.** (2007). Immunosenescence of ageing. *J. Pathol*,211(2):144-156.
66. **Gulati R., Jevremovic D., Peterson T.E., Chatterjee S., Shah V., Vile R.G., et al.** (2003). Diverse origin and function of cells with endothelial phenotype obtained from adult human blood. *Circ Res*,Nov,28,93(11):1023-5.
67. **Habib H.S., Halawa T.F., Atta H.M.** (2011). Therapeutic applications of mesenchymal stroma cells in pediatric diseases: current aspects and future perspectives. *Med Sci Monit*,Nov,17(11):RA233-239.
68. **Hale L.P.** (2004). Histologic and molecular assessment of human thymus. *Ann Diagn Pathol*,Feb;8(1):50-60.
69. **Han J., Koh Y.J., Moon H.R., Ryoo H.G., Cho C.H., Kim I., et al.** (2010). Adipose tissue is an extramedullary reservoir for functional hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood*,Feb,4,115(5):957-64.
70. **Hare J.M., Traverse J.H., Henry T.D., Dib N., Strumpf R.K., Schulman S.P., et al.** (2009). A randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-escalation study of intravenous adult human mesenchymal stem cells (prochymal) after acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*,Dec,8,54(24):2277-86.
71. **Harms M., Seale P.** (2013). Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential. *Nat Med*,Oct;19(10):1252-63.
72. **Hass R., Kasper C., Böhm S., Jacobs R.** (2011). Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. *Cell Commun Signal*,May,14,9:12.
73. **Hausman G.J., Richardson R.L.** (2004). Adipose tissue angiogenesis. *J Anim Sci*,Mar,82(3):925-34.
74. **He J., Liu Y., Zhu T., Zhu J., Dimeco F., Vescovi A.L., et al.** (2012). CD90 is identified as a candidate marker for cancer stem cells in primary high-grade gliomas using tissue microarrays. *Mol Cell Proteomics*,Jun,11(6):M111.010744.
75. **Heiss C., Keymel S., Niesler U., Ziemann J., Kelm M., Kalka C.** (2005). Impaired progenitor cell activity in age-related endothelial dysfunction. *J Am Coll Cardiol*,May3,45(9):1441-8.

76. **Herrera M.D., Mingorance C., Rodríguez-Rodríguez R., Álvarez de Sotomayor M.** (2010). Endothelial dysfunction and aging: an update. *Ageing Res Rev.*, Apr, 9(2):142-52.
77. **Hochedlinger K., Jaenisch R.** (2003). Nuclear transplantation, embryonic stem cells, and the potential for cell therapy. *N Engl J Med.*, Jul, 17, 349(3):275-86.
78. **Hollenberg C.H., Vost A.** (1969). Regulation of DNA synthesis in fat cells and stromal elements from rat adipose tissue. *J Clin Invest.*, Nov, 47(11):2485-98.
79. **Horwitz E.M., Le Blanc K., Dominici M., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F.C., et al.** (2005). Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 7(5):393-5.
80. **Hristov M., Weber C.** (2004). Endothelial progenitor cells: characterization, pathophysiology, and possible clinical relevance. *J Cell Mol Med.*, Oct-Dec, 8(4):498-508.
81. **Huang H., Song T.J., Li X., Hu L., He Q., Liu M., et al.** (2009). BMP signaling pathway is required for commitment of C3H10T1/2 pluripotent stem cells to the adipocyte lineage. *Proc Natl Acad Sci, USA.*, Aug, 4, 106(31):12670-5.
82. **Imamura M., Inoguchi T., Ikuyama S., Taniguchi S., Kobayashi K., Nakashima N., et al.** (2002). ADRP stimulates lipid accumulation and lipid droplet formation in murine fibroblasts. *Am J Physiol Endocrinol Metab.*, Oct, 283(4):E775-83.
83. **Janeczek Portalska K., Leferink A., Groen N., Fernandes H., Moroni L., van Blitterswijk C., et al.** (2012). Endothelial differentiation of mesenchymal stromal cells. *PLoS One*, 7(10):e46842.
84. **Jiang H.P., Harris S.E., Serrero G.** (1992-A). Molecular cloning of a differentiation-related mRNA in the adipogenic cell line 1246. *Cell Growth Differ.*, 3:21-30.
85. **Jiang H.P., Serrero G.** (1992-B). Isolation and characterization of a full-length cDNA coding for an adipose differentiation-related protein. *Proc Natl Acad Sci., USA*, 89:7856-7860).
86. **Jiang Y., Jahagirdar B.N., Reinhardt R.L., Schwartz R.E., Keene C.D., Ortiz-Gonzalez X.R., et al.** (2002). Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*, Jul, 4, 418(6893):41-9.
87. **Joukov V., Pajusola K., Kaipainen A., Chilov D., Lahtinen I., Kukk E., et al.** (1996). A novel vascular endothelial growth factor, VEGF-C, is a ligand for the Flt4 (VEGFR-3) and KDR (VEGFR-2) receptor tyrosine kinases. *Embo J.*, 15:290-298.
88. **Kachgal S., Putnam A.J.** (2011). Mesenchymal stem cells from adipose and bone marrow promote angiogenesis via distinct cytokine and protease expression mechanisms. *Angiogenesis*, Mar, 14(1):47-59.
89. **Kang H.J., Kim H.S., Zhang S.Y., Park K.W., Cho H.J., Koo B.K., et al.** (2004). Effects of intracoronary infusion of peripheral blood stem-cells mobilised with granulocyte-colony stimulating factor on left ventricular systolic function and restenosis after coronary stenting in myocardial infarction: the MAGIC cell randomised clinical trial. *Lancet*, Mar, 6, 363(9411):751-6.
90. **Karkkainen M.J., Haiko P., Sainio K., Partanen J., Taipale J., Petrova T.V., et al.** (2004). Vascular endothelial growth factor C is required for sprouting of the first lymphatic vessels from embryonic veins. *Nat Immunol.*, 5:74-80.

91. Kern S., Eichler H., Stoeve J., Klüter H., Bieback K. (2006). Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells*, May 24(5):1294-301
92. Kim H.J., Jang S.Y., Park J.I., Byun J., Kim D.I., Do Y.S., et al. (2004). Vascular endothelial growth factor-induced angiogenic gene therapy in patients with peripheral artery disease. *Exp Mol Med*, Aug, 31, 36(4):336-44.
93. Klagsbrun M., D'Amore P.A. (1996). Vascular endothelial growth factor and its receptors. *Cytokine Growth Factor Rev*, Oct, 7(3):259-70.
94. Kolonin M.G., Saha P.K., Chan L., Pasqualini R., Arap W. (2004). Reversal of obesity by targeted ablation of adipose tissue. *Nat Med*, Jun, 10(6):625-32.
95. Komiyama S., Sakakura C., Murayama Y., Komatsu S., Shiozaki A., Kuriu Y., et al. (2013). Adipose-derived stem cells enhance tissue regeneration of gastrotomy closure. *J Surg Res*, Dec, 185(2):945-52.
96. Kondo K., Shintani S., Shibata R., Murakami H., Murakami R., Imaizumi M., et al. (2009). Implantation of adipose-derived regenerative cells enhances ischemia-induced angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, Jan, 29(1):61-6.
97. Körbling M., Estrov Z. (2003). Adult stem cells for tissue repair - A new therapeutic concept?. *N Engl J Med*, Aug, 7, 349(6):570-82.
98. Ledoux S., Queguiner I., Msika S., Calderari S., Rufat P., Gasc J.M., et al. (2008). Angiogenesis associated with visceral and subcutaneous adipose tissue in severe human obesity. *Diabetes*, 57(12):3247-57.
99. Lee L.Y., Patel S.R., Hackett N.R., Mack C.A., Polce D.R., El-Sawy T., et al. (2000). Focal angiogen therapy using intramyocardial delivery of an adenovirus vector coding for vascular endothelial growth factor 121. *Ann Thorac Surg*, Jan, 69(1):14-23.
100. Leenders W.P., Küsters B., Verrijp K., Maass C., Wesseling P., Heerschap A., et al. (2004). Antiangiogenic therapy of cerebral melanoma metastases results in sustained tumor progression via vessel co-option. *Clin Cancer Res*, Sep, 15, 10(18Pt1):6222-30.
101. Lekstrom-Himes J., Xanthopoulos K.G. (1998). Biological role of the CCAAT/enhancer-binding protein family of transcription factors. *J Biol Chem*, Oct. 30. 273(44):28545-8.
102. Li L., Xia Y. (2014). Study of Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells Transplantation for Rats with Dilated Cardiomyopathy. *Ann Thorac Cardiovasc Surg*, Feb, 4[Epub ahead of print].
103. Liekens S., De Clercq E., Neyts J. (2001). Angiogenesis: regulators and clinical applications. *Biochem. Pharmacol.*, 61:253-270.
104. Lievreumont M., Potus J., Guillou B. (1982). Use of alizarin red S for histochemical staining of Ca²⁺ in the mouse; some parameters of the chemical reaction in vitro. *Acta Anat (Basel)*, 114(3):268-80.
105. Lijnen H.R. (2008). Angiogenesis and obesity. *Cardiovasc Res*, 1, 78(2):286-93.

106. **Liu Z.J., Zhuge Y., Velazquez O.C.** (2009). Trafficking and differentiation of mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem.,Apr,15,106(6):*984-91.
107. **Lovett M., Lee K., Edwards A., Kaplan D.L.** (2009). Vascularization strategies for tissue engineering. *Tissue Eng Part B Rev.,Sep,15(3):*353-70.
108. **Madonna R., De Caterina R.** (2010). Adipose tissue: A new source for cardiovascular repair. *J Cardiovasc Med (Hagerstown),Feb,11(2):*71-80.
109. **Madonna R., Geng Y.J., De Caterina R.** (2009). Adipose tissue-derived stem cells: characterization and potential for cardiovascular repair. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.,Nov,29(11):*1723-9.
110. **Madonna R., Renna F.V., Cellini C., Cotellesse R., Picardi N., Francomano F., et al.** (2011). Age dependent impairment of number and angiogenic potential of adipose tissue-derived progenitor cells. *Eur J Clin Invest.,Feb,41(2):*126-33.
111. **Maeda K., Cao H., Kono K., Gorgun C.Z., Furuhashi M., Uysal K.T., et al.** (2005) Adipocyte/macrophage fatty acid binding proteins control integrated metabolic responses in obesity and diabetes. *Cell Metab.,1:*107-119.
112. **Makowski L., Hotamisligil G.S.** (2004). Fatty acid binding-proteins-the evolutionary crossroads of inflammatory and metabolic responses. *J Nutr.,134:*2464S-2468S.
113. **Martínez Poveda B., Muñoz-Chápuli R., Riguera R., Fernández A., Medina MA., R. Quesada A.** (2008). DTD, an anti-inflammatory ditriazine, inhibits angiogenesis *in vitro* and *in vivo*. *J Cell Mol Med.,12(4):*1211-9.
114. **Martins V.C., Ruggiero E., Schlenner S.M., Madan V., Schmidt M., Fink P.J., et al.** (2012). Thymus-autonomous T cell development in the absence of progenitor import. *J. Exp. Med., Jul 30;209(8):*1409-17.
115. **Masouyé I., Hagens G., Van Kuppevelt T.H., Madsen P., Saurat J.H., Veerkamp J.H., et al.** (1997). Endothelial cells of the human microvasculature express epidermal fatty acid-binding protein. *Circ Res.,Sep,81(3):*297-303.
116. **Menasché P.** (2003). Skeletal muscle satellite cell transplantation. *Cardiovasc Res.,May,1,58(2):*351-7.
117. **Meruane M., Rojas M.** (2010). Adipose Tissue Derived Stem Cells. *Int. J. Morphol.,28(3):*879-89.
118. **Messina E., De Angelis L., Frati G., Morrone S., Chimenti S., Fiordaliso F., et al.** (2004). Isolation and expansion of adult cardiac stem cells from human and murine heart. *Circ Res.,Oct,29,95(9):*911-21.
119. **Miettinen M., Rikala M.S., Rys J., Lasota J., Wang Z.F.** (2012). Vascular endothelial growth factor receptor 2 as a marker for malignant vascular tumors and mesothelioma: an immunohistochemical study of 262 vascular endothelial and 1640 nonvascular tumors. *Am J Surg Pathol.,Apr,36(4):*629-39.
120. **Miller J.F.** (2002). The discovery of thymus function and of thymus-derived lymphocytes. *Immunol Rev.,185:*7-14.

121. **Minteer D., Marra K.G., Rubin J.P.** (2013). Adipose-derived mesenchymal stem cells: biology and potential applications. *Adv Biochem Eng Biotechnol.*,129:59-71.
122. **Miranville A., Heeschen C., Sengenès C., Curat C.A., Busse R., Bouloumié A.** (2004). Improvement of postnatal neovascularization by human adipose tissue-derived stem cells. *Circulation*,Jul,20,110(3):349-55.
123. **Mitchell J.B., McIntosh K., Zvonic S., Garrett S., Floyd Z.E., Kloster A., et al.** (2006). Immunophenotype of human adipose-derived cells: temporal changes in stromal-associated and stem cell-associated markers. *Stem Cells*,Feb,24(2):376-85.
124. **Miyahara Y., Nagaya N., Kataoka M., Yanagawa B., Tanaka K., Hao H., et al.** (2006). Monolayered mesenchymal stem cells repair scarred myocardium after myocardial infarction. *Nat Med.*,Apr,12(4):459-65.
125. **Moon M.H., Kim S.Y., Kim Y.J., Kim S.J., Lee J.B., Bae Y.C., et al.** (2006). Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells improve postnatal neovascularization in a mouse model of hindlimb ischemia. *Cell Physiol Biochem.*,17(5-6):279-90.
126. **Moore K.L., Persaud T.V.N., Torchia M.G.** (2007). The Developing Human; Clinically Oriented Embryology. 8th ed. Philadelphia:Saunders.
127. **Morrison R.F., Farmer S.R.** (1999). Role of PPARgamma in regulating a cascade expression of cyclin-dependent kinase inhibitors, p18(INK4c) and p21(Waf1/Cip1), during adipogenesis. *J Biol Chem.*,274:17088–17097.
128. **Morroni M., Barbatelli G., Zingaretti M.C., Cinti S.** (1995). Immunohistochemical, ultrastructural and morphometric evidence for brown adipose tissue recruitment due to cold acclimation in old rats. *Int J Obes Relat Metab Disord.*,19:126-131.
129. **Mueller E., Drori S., Aiyer A., Yie J., Sarraf P., Chen H., et al.** (2002). Genetic analysis of adipogenesis through peroxisome proliferator-activated receptor gamma isoforms. *J Biol. Chem.*,277:41925-30.
130. **Mukherjee D., Bhatt D.L., Roe M.T., Patel V., Ellis S.G.** (1999). Direct myocardial revascularization and angiogenesis: how many patients might be eligible? *Am J Cardiol.*,Sep,1,84(5):598-600,A8.
131. **Müller A.M., Hermanns M.I., Skrzynski C., Nesslinger M., Müller K.M., Kirkpatrick C.J.** (2002). Expression of the endothelial markers PECAM-1, vWf, and CD34 in vivo and in vitro. *Exp Mol Pathol.*,Jun,72(3):221-9.
132. **Nae S., Bordeianu I., Stăncioiu A.T., Antohi N.** (2013). Human adipose-derived stem cells: definition, isolation, tissue-engineering applications. *Rom J Morphol Embryol.*,54(4):919-24.
133. **Nakagami H., Morishita R., Maeda K., Kikuchi Y., Ogihara T., Kaneda Y.** (2006). Adipose tissue-derived stromal cells as a novel option for regenerative cell therapy. *J Atheroscler Thromb.*,Apr,13(2):77-81.
134. **Nedergaard J., Bengtsson T., Cannon B.** (2010). Three years with adult human brown adipose tissue. *Ann N Y Acad Sci.*,Nov.1212:E20-36.

135. **Nombela-Arrieta C., Ritz J., Silberstein L.E.** (2011). The elusive nature and function of mesenchymal stem cells. *Nat Rev Mol Cell Biol.,Feb,12(2):126-31.*
136. **Olofsson B., Korpelainen E., Pepper M.S., Mandriota S.J., Aase K., Kumar V.** (1998). Vascular endothelial growth factor B (VEGF-B) binds to VEGF receptor-1 and regulates plasminogen activator activity in endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci,USA,95:11709-14.*
137. **Olsson A.K., Dimberg A., Kreuger J., Claesson-Welsh L.** (2006). VEGF receptor signalling - in control of vascular function. *Nat Rev Mol Cell Biol.,May,7(5):359-71.*
138. **Oosthuysen B., Moons L., Storkebaum E., Beck H., Nuyens D., Brusselmans K., et al.** (2001). Deletion of the hypoxiaresponse element in the vascular endothelial growth factor promoter causes motor neuron degeneration. *Nat Genet.,2001,Jun,28(2):131-8.*
139. **Oswald J., Boxberger S., Jørgensen B., Feldmann S., Ehninger G., Bornhäuser M., et al.** (2004). Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells in vitro. *Stem Cells,22(3):377-84.*
140. **Otto T.C., Lane M.D.** (2005). Adipose development: from stem cell to adipocyte. *Crit Rev Biochem Mol Biol.,Jul-Aug,40(4):229-42.*
141. **Pacifico A.D., Sears N.J., Burgos C.** (1986). Harvesting, routing, and anastomosing the left internal mammary artery graft. *Ann Thorac Surg.,Dec,42(6):708-10.*
142. **Peichev M., Naiyer A.J., Pereira D., Zhu Z., Lane W.J., Williams M.** (2000). Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood,Feb,1,95(3):952-8.*
143. **Perin E.C., Dohmann H.F., Borojevic R., Silva S.A., Sousa A.L., Mesquita C.T., et al.** (2003). Transendocardial, autologous bone marrow cell transplantation for severe, chronic ischemic heart failure. *Circulation,May,13,107(18):2294-302.*
144. **Petrovic N., Walden T.B., Shabalina I.G., Timmons J.A., Cannon B., Nedergaard J.** (2010). Chronic peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) activation of epididymally derived white adipocyte cultures reveals a population of thermogenically competent, UCP1-containing adipocytes molecularly distinct from classic brown adipocytes. *J Biol Chem.,Mar5;285(10):7153-64.*
145. **Pinho S., Lacombe J., Hanoun M., Mizoguchi T., Bruns I., Kunisaki Y., et al.** (2013). PDGFR α and CD51 mark human nestin+ sphere-forming mesenchymal stem cells capable of hematopoietic progenitor cell expansion. *J Exp Med.,Jul,1;210(7):1351-67.*
146. **Planat-Benard V., Silvestre J.S., Cousin B., Andre M., Nibbelink M., Tamarat R., et al.** (2004). Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives. *Circulation,Feb,10,109(5):656-63.*
147. **Popova A.P., Bozyk P.D., Goldsmith A.M., Linn M.J., Lei J., Bentley J.K., et al.** (2010). Autocrine production of TGF-beta1 promotes myofibroblastic differentiation of neonatal lung mesenchymal stem cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.,Jun,298(6):L735-43.*
148. **Prelog M.** (2006). Aging of the immune system: a risk factor for autoimmunity?. *Autoimmun Rev.,5(2):136-139.*

149. **Psaltis P.J., Zannettino A.C., Worthley S.G., Gronthos S.** (2008). Concise review: mesenchymal stromal cells: potential for cardiovascular repair. *Stem Cells., Sep, 26(9):*2201-10.
150. **Pusztaszeri M.P., Seelentag W., Bosman F.T.** (2006). Immunohistochemical expression of endothelial markers CD31, CD34, von Willebrand factor, and Fli-1 in normal human tissues. *J Histochem Cytochem., Apr, 54(4):*385-95.
151. **Rada T., Reis R.L., Gomes M.E.** (2009). Adipose tissue-derived stem cells and their application in bone and cartilage tissue engineering. *Tissue Eng Part B Rev., Jun, 15(2):*113-25.
152. **Rada T., Santos T.C., Marques A.P., Correlo V.M., Frias A.M., Castro A.G., et al.** (2012). Osteogenic differentiation of two distinct subpopulations of human adipose-derived stem cells: an in vitro and in vivo study. *J Tissue Eng Regen Med., Jan, 6(1):*1-11.
153. **Rajagopalan S., Shah M., Luciano A., Crystal R., Nabel E.G.** (2001). Adenovirus-mediated gene transfer of VEGF(121) improves lower-extremity endothelial function and flow reserve. *Circulation, Aug, 14, 104(7):*753-5.
154. **Ramírez-Zacarías J.L., Castro-Muñozledo F., Kuri-Harcuch W.** (1992). Quantitation of adipose conversion and triglycerides by staining intracytoplasmic lipids with Oil red O. *Histochemistry, Jul; 97(6):*493-7.
155. **Rathore K.S., Edwards J., Stuklis R.** (2009). "Pulmonary slit" procedure for preventing tension on the left internal thoracic artery graft. *Tex Heart Inst J., 36(2):*131-3.
156. **Rege, T.A., Hagood, J.S.** (2006). Thy-1 as a regulator of cell-cell and cell-matrix interactions in axon regeneration, apoptosis, adhesion, migration, cancer, and fibrosis. *Faseb J., 20:*1045-54.
157. **Rehman J., Li J., Orschell C.M., March K.L.** (2003). Peripheral blood "endothelial progenitor cells" are derived from monocyte/macrophages and secrete angiogenic growth factors. *Circulation, Mar, 4, 107(8):*1164-9.
158. **Rehman J., Traktuev D., Li J., Merfeld-Clauss S., Temm-Grove C.J., Bovenkerk J.E.** (2004). Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. *Circulation, Mar 16, 109(10):*1292-8.
159. **Rosen E.D., Hsu C.H., Wang X., Sakai S., Freeman M.W., Gonzalez F.J., et al.** (2002). C/EBPalpha induces adipogenesis through PPARgamma: a unified pathway. *Genes Dev. 16:*22-26.
160. **Rosengart T.K., Lee L.Y., Patel S.R., Kligfield P.D., Okin P.M., Hackett N.R., et al.** (1999). Six-month assessment of a phase I trial of angiogenic gene therapy for the treatment of coronary artery disease using direct intramyocardial administration of an adenovirus vector expressing the VEGF121 cDNA. *Ann Surg., Oct, 230(4):*466-70.
161. **Rupnick M.A., Panigrahy D., Zhang C.Y., Dallabrida S.M., Lowell B.B., Langer R., et al.** (2002). Adipose tissue mass can be regulated through the vasculature. *Proc Natl Acad Sci, USA, Aug, 6, 99(16):*10730-5.
162. **Sabroe I., Jones E.C., Usher L.R., Whyte M.K., Dower S.K.** (2002). Toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 in human peripheral blood granulocytes: a critical role for monocytes in leukocyte lipopolysaccharide responses. *J Immunol., May, 1, 168(9):*4701-10.

163. **Sadoun E., Reed M.J.** (2003). Impaired Angiogenesis in Aging Is Associated with Alterations in Vessel Density, Matrix Composition, Inflammatory Response, and Growth Factor Expression. *J Histochem Cytochem., Sep, 51(9):1119-30.*
164. **Saiki A., Watanabe F., Murano T., Miyashita Y., Shirai K.** (2006). Hepatocyte growth factor secreted by cultured adipocytes promotes tube formation of vascular endothelial cells in vitro. *Int J Obes (Lond), Nov, 30(11):1676-84.*
165. **Salas J., de Vega N.G., Gallego J.L., Bondía J.A.** (1990). Surgical treatment of postoperative mediastinitis in heart surgery using omentoplasty. *Rev Esp Cardiol., Apr, 43(4):257-61.*
166. **Salas J., Montiel M., Jiménez E., Valenzuela M., Valderrama J.F., Castillo R., et al.** (2009). Angiogenic properties of adult human thymus fat. *Cell Tissue Res., Nov, 338(2):313-8.*
167. **Sanson P., Vescovini R., Fagnoni F., Biasini C., Zanni F., Telera A., et al.** (2008). The immune system in extreme longevity. *Experimental Gerontology, 43:61-5.*
168. **Sarkanen J.R., Kaila V., Mannerström B., Rätty S., Kuokkanen H., Miettinen S., et al.** (2012). Human adipose tissue extract induces angiogenesis and adipogenesis in vitro. *Tissue Eng Part A., Jan, 18(1-2):17-25.*
169. **Sarkar N., Rück A., Källner G., Y-Hassan S., Blomberg P., Islam K.B., et al** (2001). Effects of intramyocardial injection of phVEGF-A165 as sole therapy in patients with refractory coronary artery disease--12-month follow-up: angiogenic gene therapy. *J Intern Med., Nov, 250(5):373-81.*
170. **Scott R.E., Florine D.L., Wille J.J. Jr., y Yun K.** (1982). Coupling of growth arrest and differentiation at a distinct state in the G1 phase of the cell cycle: GD. *Proc Natl Acad Sci, USA, 79:845-849.*
171. **Seale P., Bjork B., Yang W., Kajimura S., Chin S., Kuang S., et al.** (2008). PRDM16 controls a brown fat/skeletal muscle switch. *Nature, 454:961-967.*
172. **Serini G., Napione L., Arese M., Bussolino F.** (2008). Besides adhesion: new perspectives of integrin functions in angiogenesis. *Cardiovasc Res., May, 1, 78(2):213-22.*
173. **Sharma R.K., Voelker D.J., Sharma R., Reddy H.K.** (2012). Understanding the application of stem cell therapy in cardiovascular diseases. *Stem Cells Cloning., Oct, 30, 5:29-37.*
174. **Siegel G., Kluba T., Hermanutz-Klein U., Bieback K., Northoff H., Schäfer R.** (2013). Phenotype, donor age and gender affect function of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *BMC Med., Jun, 11, 11:146.*
175. **Sierra-Honigmann M.R., Nath A.K., Murakami C., García-Cardena G., Papapetropoulos A., Sessa W.C., et al.** (1998). Biological action of leptin as an angiogenic factor. *Science, Sep, 11, 281(5383):1683-6.*
176. **Siminiak T., Kurpisz M.** (2003). Myocardial replacement therapy. *Circulation, Sep, 9, 108(10):1167-71.*
177. **Smorlesi A., Frontini A., Giordano A., Cinti S.** (2012). The adipose organ: white-brown adipocyte plasticity and metabolic inflammation. *Obes Rev., 13, Suppl2:83-96.*

178. **Socarrás-Ferrer B.B., del Valle-Pérez L.O., de la Cuétara-Bernal K., Marsán-Suárez V., Sánchez Segura M., Macías-Abraham C.** (2013). Mesenchymal stem cells: relevant aspects and clinical applications in regenerative medicine. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter.*,29(1):16-23.
179. **Solban N., Selbo P.K., Sinha A.K., Chang S.K., Hasan T.** (2006). Mechanistic investigation and implications of photodynamic therapy induction of vascular endothelial growth factor in prostate cancer. *Cancer Res.*,Jun,1,66(11):5633-40.
180. **Sosman J.A., Mier J.W.** (2003). Biological drug duo delivers one-two tumor punch. *Nat Med.*,Jun,9(6):649-50.
181. **Soukas A., Socci N.D., Saatkamp B.D., Novelli S., Friedman J.M.** (2001). Distinct transcriptional profiles of adipogenesis in vivo and in vitro. *J. Biol. Chem.*,276:34167-74.
182. **Stacker S.A., Caesar C., Baldwin M.E., Thornton G.E., Williams R.A., Prevo R., et al.** (2001). VEGF-D promotes the metastatic spread of tumor cells via the lymphatics. *Nat Med.*,Feb,7(2):186-91.
183. **Steiner S., Wahl D., Magold B.L.K., Robison R., Raymackers L., Metheus L., et al.** (1996). *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 218:777-782.
184. **Strauer B.E., Brehm M., Zeus T., Köstering M., Hernandez A., Sorg R.V., et al.** (2002). Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans. *Circulation*,Oct,8,106(15):1913-8.
185. **Sumi M., Sata M., Toya N., Yanaga K., Ohki T., Nagai R.** (2007). Transplantation of adipose stromal cells, but not mature adipocytes, augments ischemia-induced angiogenesis. *Life Sci*,Jan,16,80(6):559-65.
186. **Suuronen E.J., Wong S., Kapila V., Waghray G., Whitman S.C., Mesana T.G., et al.** (2006). Generation of CD133+ cells from CD133- peripheral blood mononuclear cells and their properties. *Cardiovasc Res.*,Apr,1,70(1):126-35.
187. **Takahashi T., Kalka C., Masuda H., Chen D., Silver M., Kearney M., et al.** (1999). Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nat Med.*,Apr,5(4):434-8.
188. **Tang Q.Q., Otto T.C., Lane, M.D.** (2003). CCAAT/enhancer-binding protein beta is required for mitotic clonal expansion during adipogenesis. *Proc Natl Acad Sci,USA*,100:850-855.
189. **Tang W., Zeve D., Suh J. M., Bosnakovski D., Kyba M., Hammer R. E., et al.** (2008). White fat progenitor cells reside in the adipose vasculature. *Science*,322:583-586.
190. **Tchoukalova Y.D., Sarr M.G., Jensen M.D.** (2004). Measuring committed preadipocytes in human adipose tissue from severely obese patients by using adipocyte fatty acid binding protein. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*,287:R1132-R1140.
191. **Thomson J.A., Itskovitz-Eldor J., Shapiro S.S., Waknitz M.A., Swiergiel J.J., Marshall V.S. et al.** (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*,Nov,6,282(5391):1145-7.

192. **Tinahones F., Salas J., Mayas M.D., Ruiz-Villalba A., Macias-Gonzalez M., Garrido-Sanchez L., et al.** (2009). VEGF gene expression in adult human thymus fat: a correlative study with hypoxic induced factor and cyclooxygenase-2. *PLoS One*, Dec, 14, 4(12):e8213.
193. **Tio R.A., Tkebuchava T., Scheuermann T.H., Lebherz C., Magner M., Kearny M., et al.** (1999). Intramyocardial gene therapy with naked DNA encoding vascular endothelial growth factor improves collateral flow to ischemic myocardium. *Hum Gene Ther.*, Dec., 10, 10(18):2953-60.
194. **Tontonoz P., Hu E., Spiegelman B.M.** (1994). Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor. *Cell*, 79:1147-1156.
195. **Trayhurn P., Beattie J.H.** (2001). Physiological role of adipose tissue: white adipose tissue as an endocrine and secretory organ. *Proc Nutr Soc.*, Aug, 60(3):329-39.
196. **Tsurumi Y., Kearney M., Chen D., Silver M., Takeshita S., Yang J., et al.** (1997). Treatment of acute limb ischemia by intramuscular injection of vascular endothelial growth factor gene. *Circulation.*, Nov, 4, 96(9 Suppl):II-382-8.
197. **Valdés Chavarri M., Pascual Figal D., Prósper Cardoso F., Moreno Montañés J., García Olmos D., Barcia Albacar J.A.** (2005). Regenerative medicine with adult stem cells. *Rev Clin Esp.*, Nov, 205(11):556-64.
198. **Valet P., Tavernier G., Castan-Laurell I., Saulnier-Blache J.S., Langin D.** (2002). Understanding adipose tissue development from transgenic animal models. *J Lipid Res.*, Jun, 43(6):835-60.
199. **Valina C., Pinkernell K., Song Y.H., Bai X., Sadat S., Campeau R.J., et al.** (2007). Intracoronary administration of autologous adipose tissue-derived stem cells improves left ventricular function, perfusion, and remodeling after acute myocardial infarction. *Eur Heart J.*, Nov, 28(21):2667-77.
200. **Vitali A., Murano I., Zingaretti M.C., Frontini A., Ricquier D., Cinti S.** (2012). The adipose organ of obesity-prone C57BL/6J mice is composed of mixed white and brown adipocytes. *J. Lipid Res.*, 53:619-629.
201. **Wang H., Keiser J.A., Olszewski B., Rosebury W., Robertson A., Kovsdi I., et al.** (2004). Delayed angiogenesis in aging rats and therapeutic effect of adenoviral gene transfer of VEGF. *Int J Mol Med.*, Apr, 13(4):581-7.
202. **Wang M., Crisostomo P., Herring C., Meldrum K.K., Meldrum D.R.** (2006). Human progenitor cells from bone marrow or adipose tissue produce VEGF, HGF and IGF-1 in response to TNF by a p38 mitogen activated protein kinase dependent mechanism. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 291(4):R880-4.
203. **Wang S., Li X., Parra M., Verdin E., Bassel-Duby R., Olson E.N.** (2008). Control of endothelial cell proliferation and migration by VEGF signaling to histone deacetylase. *Proc Natl Acad Sci., USA*, Jun 3, 105(22):7738-43.
204. **Wellen K.E., Hotamisligil G.S.** (2003). Obesity-induced inflammatory changes in adipose tissue. *J Clin Invest.*, Dec, 112(12):1785-8.

205. **Wellen K.E., Hotamisligil G.S.** (2005). Inflammation, stress, and diabetes. *J Clin Invest.*, May, 115(5):1111-9.
206. **Wilkison W.O., Choy L., Spiegelman B.M.** (1991). Biosynthetic regulation of monobutyryl, an adipocyte-secreted lipid with angiogenic activity. *J Biol Chem.*, Sep, 266(25):16886-91.
207. **Witte L., Hicklin D.J., Zhu Z., Pytowski B., Kotanides H., Rockwell P., et al.** (1998). Monoclonal antibodies targeting the VEGF receptor-2 (Flk1/KDR) as an anti-angiogenic therapeutic strategy. *Cancer Metastasis Rev.*, Jun, 17(2):155-61.
208. **Wollert K.C., Drexler H.** (2005). Clinical applications of stem cells for the heart. *Circ Res.*, Feb, 4, 96(2):151-63.
209. **Woodfin A., Voisin M.B., Nourshargh S.** (2007). Pecam-1: A multi-functional molecule in inflammation and vascular biology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, 27:2514-23.
210. **Wu J., Cohen P., Spiegelman B.M.** (2013). Adaptive thermogenesis in adipocytes: is beige the new brown?. *Genes Dev.*, 27:234-250.
211. **Xu A., Wang Y., Xu J.Y., Stejskal D., Tam S., Zhang J., et al.** (2006). Adipocyte fatty acid-binding protein is a plasma biomarker associated with obesity and Metabolic Syndrome. *Clin Chem.*, 52:405-413.
212. **Yeh W.C., Cao Z., Classon M., McKnight S.L.** (1995). Cascade regulation of terminal adipocyte differentiation by three members of the C/EBP family of leucine zipper proteins. *Genes Dev.*, 9:168-181.
213. **Zhang J.W., Tang Q.Q., Vinson C., Lane M.D.** (2004). Dominant-negative C/EBP disrupts mitotic clonal expansion and differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. *Proc Natl Acad Sci, USA*, 101:43-47.
214. **Zuk P.A., Zhu M., Ashjian P., De Ugarte D.A., Huang J.I., Mizuno H., et al.** (2002). Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell.*, Dec, 13(12):4279-95.
215. **Zuk P.A., Zhu M., Mizuno H., Huang J., Futrell J.W., Katz A.J., et al.** (2001). Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng.*, Apr, 7(2):211-228.

FINANCIACIÓN Y PRODUCCIÓN

Este trabajo de investigación se ha llevado a cabo gracias a la financiación de los siguientes proyectos de investigación e instituciones:

- Proyecto: “Estudio de la posible Función Angiogénica de la grasa tímica del adulto en la Cardiopatía Isquémica y sus Mecanismos Moleculares”.
 - Investigador principal: Dra. Rajaa El Bekay
 - Entidad financiadora: Consejería de Salud: 2008/PI-0251/2007.
 - Cuantía: 38700€.
 - Duración: Enero 2008 - Diciembre 2010.

- Proyecto: “Estudio de la posible Función Angiogénica de la grasa tímica del adulto en la Cardiopatía Isquémica y sus Mecanismos Moleculares”.
 - Investigador principal: Dra. Rajaa El Bekay
 - Entidad financiadora: Instituto de Salud Carlos III: FIS 2008/IP07/00288.
 - Cuantía: 41400€.
 - Duración: Enero 2008 - Diciembre 2010.

- Institución: Ciber Fisiopatología Obesidad y Nutrición (Ciberobn).
 - Grupo de Investigación: Dr. Francisco Tinahones.
 - Hospital Clínico Virgen de la Victoria, Málaga.
 - Octubre 2010 - Actualmente.

Este trabajo de investigación se ha presentado, parcialmente, en los siguientes congresos:

- 36º Congreso de la Sociedad Andaluza de Endocrinología y Nutrición (SAEN). Sevilla (Noviembre - 2011).
 - o Grasa tímica como mejor fuente potencial de angiogénesis en pacientes con edad superior a 70 años con isquemia miocárdica.
Póster.

- 54 Congreso Nacional de la Sociedad Española de Endocrinología y Nutrición (SEEN). Oviedo (Mayo – 2012).
 - o Grasa tímica como mejor fuente potencial de angiogénesis en pacientes con edad superior a 70 años con isquemia miocárdica.
Comunicación Oral. Premio a la mejor comunicación básica presentada por un investigador en formación de la SEEN.

Este trabajo de investigación ha dado lugar a los siguientes artículos científicos:

- Coín Aragüez L, Murri M, Oliva Olivera W, Salas J, Mayas MD, Delgado-Lista J, Tinahones F, El Bekay R. (2013). Thymus fat as an attractive source of angiogenic factors in elderly subjects with myocardial ischemia. *Age, Aug, 35(4):1263-75*. doi: 10.1007/s11357-012-9418-6. Epub 2012 May 11.

PUBLICACIONES CIENTÍFICAS

Thymus fat as an attractive source of angiogenic factors in elderly subjects with myocardial ischemia

Leticia Coín Aragüez · Mora Murri ·
Wilfredo Oliva Olivera · Julian Salas ·
Maria Dolores Mayas · Javier Delgado-Lista ·
Francisco Tinahones · Rajaa El Bekay

Received: 14 November 2011 / Accepted: 18 April 2012 / Published online: 11 May 2012
© American Aging Association 2012

Abstract Aging negatively affects angiogenesis which is found to be linked to declined vascular endothelial growth factor (VEGF) production. Adult human thymus degenerates into fat tissue (thymus adipose tissue (TAT)). Recently, we described that TAT from cardiomyopathy ischemic subjects has angiogenic properties. The goal of our study was to analyze whether aging could also impair angiogenic properties in TAT as in other adipose tissue such as subcutaneous (subcutaneous adipose tissue (SAT)). SAT and TAT specimens were obtained from 35 patients undergoing cardiac surgery, making these tissues readily available as a prime source of adipose tissue. Patients were separated into two age-dependent

groups; middle-aged ($n=18$) and elderly ($n=17$). Angiogenic, endothelial, and adipogenic expression markers were analyzed in both tissues from each group and correlations were examined between these parameters and also with age. There were no significant differences in subjects from either group in clinical or biological variables. Angiogenic markers VEGF-A, B, C, and D and adipogenic parameters, peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR γ 2), FABP4, and ADRP showed elevated expression levels in TAT from elderly patients compared to the middle-aged group, while in SAT, expression levels of these isoforms were significantly decreased in elderly patients. VEGF-R1, VEGF-R2, VEGF-R3, Thy1,

Leticia Coín Aragüez and Mora Murri have contributed equally.

L. Coín Aragüez · M. Murri · W. Oliva Olivera ·
M. D. Mayas · F. Tinahones · R. El Bekay (✉)
CIBER Fisiopatología Obesidad y Nutrición (CB06/03),
Instituto de Salud Carlos III,
Málaga, Spain

L. Coín Aragüez · M. Murri · W. Oliva Olivera ·
M. D. Mayas · F. Tinahones · R. El Bekay (✉)
Laboratorio de Investigación Biomédica,
Hospital Clínico Universitario Virgen de la Victoria,
Campus de Teatinos s/n 29010,
Málaga, Spain
e-mail: elbekay@gmail.com

J. Salas
Departamento de Cirugía Cardiovascular,
Hospital Regional Universitario Carlos Haya,
Málaga, Spain

J. Delgado-Lista
Unidad de Lípidos y Arteriosclerosis,
Hospital Universitario Reina Sofía,
Córdoba, Spain

F. Tinahones (✉)
Servicio de Endocrinología, Hospital Virgen de la Victoria,
Málaga, Spain
e-mail: fjtinahones@hotmail.com

CD31, CD29, and VLA1 showed increased levels in TAT from the elderly compared to the middle-aged, while in SAT these levels displayed a decline with aging. Also, in TAT, angiogenic and endothelial parameters exhibited strong positive correlations with age. TAT appears to be the most appropriate source of angiogenic and endothelial factors in elderly cardiomyopathy subjects compared to SAT.

Keywords Human aging · Ischemic cardiomyopathy · Adult thymus adipose tissue · Subcutaneous adipose tissue · Angiogenic factors · Endothelial markers

Introduction

Angiogenesis, the formation of new vessels from existing vasculature, becomes impaired with age. The formation of capillaries was first noted to be decreased in middle-aged rats relative to young rats (Arthur et al. 1998a), a phenomenon that has been confirmed subsequently in other animal models and in humans where it has been shown that functional impairment of endothelial progenitor cells from elderly subjects has been shown to correlate with endothelial dysfunction (Heiss et al. 2005). Human and murine adipose-derived stromal cells have been shown to release many potent angiogenic factors and differentiate into endothelial cells (Miranville et al. 2004; Moon et al. 2006), which makes adipose tissue an attractive option and has tremendous potential in the field of therapeutic neovascularization.

It has been shown that the thymus grows rapidly during embryonic life and during childhood, reaching its maximum absolute size in puberty; thereafter, growth ceases and involutes gradually until old age, when the gland is often smaller than at birth (Hale 2004). This age involution is shown by a decrease in the overall weight of the organ, associated lymphoid tissue atrophy and replacement by mature adipose tissue (Hale 2004). For this reason, all the studies carried out on adult thymus involution have been focused primarily on the immunological aspect; however, it has never been considered interesting enough to be studied as a potential source of humoral and/or angiogenic factors, even its differential characteristics, with respect to other adipose tissues, have

never been studied before. Part of this tissue is discarded in aortic cannulation procedures of the ascending aorta in cardiovascular surgery in patients in need of a cardiopulmonary bypass (CPB), making this tissue a readily available prime source of adipose tissue.

Vascular endothelial growth factor (VEGF) is the first member of angiogenic factors to be cloned and remains today the best-characterized angiogenic growth factor (Ferrara et al. 2003). VEGF was first described as a vascular permeability factor (Dvorak et al. 1999) and is recognized as being a potent stimulator of endothelial proliferation and migration (Wang et al. 2008). Gene targeting studies have demonstrated the critical importance of VEGF for both vasculogenesis and angiogenesis (Ferrara et al. 1996). It has been proven that white adipose tissue produces and secretes many different types of proangiogenic factors, such as VEGF-A and VEGF-B, the two key angiogenic factors produced by adipocytes (Saiki et al. 2006). Other adipose-tissue derived factors with pro-angiogenic properties are VEGF-C and VEGF-D, which have been found to be important in the proper formation and maintenance of the lymphatic network (Asano et al. 2001). As a result, VEGF has been used in numerous preclinical and early clinical gene or protein therapy trials with varying degrees of success (Sosman and Mier 2003). Substantial changes in the adhesive interactions between cells and the extracellular matrix (ECM) take place to permit endothelial cell migration during angiogenesis. These interactions are mediated by integrins such as CD29, CD31, CD49, CD73, CD90, etc. Interactions between these specific integrins and growth factor receptors such as VEGF-Rs mediate pro-angiogenic effects (Serini et al. 2008).

We have recently found that thymus fat produces a variety of angiogenic factors such as angiopoietin, Tie2, VEGF, VEGF-R1, and VEGF-R2. Furthermore, human umbilical cord endothelial cells cultured in the presence of thymus fat extract displayed enhanced proliferative and migratory responses, which are two relevant steps in angiogenesis (Salas et al. 2009). We have also shown that thymus adipose tissue (TAT) displays similar inflammatory and anti-inflammatory mechanisms to those observed in other adipose tissues, including subcutaneous adipose tissue (Tinahones et al. 2009). These findings lead us to believe that TAT

is an interesting source of angiogenic factors which may, in the future, have a relevant role in promoting angiogenesis and tissue repair. The goal of our study was to analyze and compare the variation of expression levels of angiogenic endothelial and adipogenic parameters in human thymus and subcutaneous adipose tissues in relation to the increase of age, and then to investigate whether aging impairs the angiogenic properties in TAT as in subcutaneous.

Material and methods

Patients and adipose tissue collection

The study recruited patients who received a coronary-artery bypass graft with a CPB in the Carlos Haya Hospital. The mean number of grafts used was 3.1 per patient. The subjects operated on and recruited in this study were individuals with stable situations and without severe ischemic injury. Therefore, these subjects were without infarct or with a previous infarct at least 6 months before surgery. Moreover, none the subjects of this study suffered from ischemic peripheral arteriopathy of the legs which could also alter gene expression of angiogenic factors. The number of patients recruited for RNA and protein expression analysis was $n=35$. The study was carried out on two groups of patients: the middle-aged group, aged from 45 to 65 ($n=18$), and the elderly group of patients with an age of 70 or over. For the flow cytometry study, the number of patients with similar clinicopathological characteristics was 12 ($n=6$ middle aged, and $n=6$ elderly). This study was approved by the local ethical committee of the Carlos Haya Hospital, and signed informed consent was obtained from all participating patients by the Spanish Society of Thoracic and Cardiovascular Surgery (SECTCV).

The relevant clinical and metabolic characteristics of these subjects are shown in Table 1. Both subcutaneous and thymus adipose tissues were obtained at the beginning of the procedure and before heart arrest. The site of subcutaneous fat harvest was from the chest incision. Tissues were immediately stored at -80°C for RNA and protein expression analysis. Fresh tissues were processed for flow cytometry.

RNA extraction

Total RNA was isolated from adipose tissue using the Trizol RNA isolation method (Invitrogen, Carlsbad, CA) and purified with the RNeasy Lipid kit (Qiagen, Valencia, CA)

Real-time PCR

The amplifications were performed using a MicroAmp optical 96-well reaction plate (PE Applied Biosystems) on an ABI 7500 real-time PCR system (Applied Biosystems). RT qPCR reactions were carried out for all genes using specific TaqMan gene expression assays. During PCR, the Ct values for each amplified product were determined using a threshold value of 0.1. The specific signals were normalized by constitutively expressed cyclophilin signals using the formula $2^{-\Delta\text{Ct}}$.

TaqMan® gene expression assay probes

VEGF-A	Hs00173626_m1
VEGF-B	Hs00957984_m1
VEGF-C	Hs00153458_m1
VEGF-D	Hs01128659_m1
VEGF-R1/FLT1	Hs01052935_m1
VEGF-R2/(KDR/Flk-1)	Hs00176676_m1
VEGF-R3/FLT4	Hs01047674_m1
CD90/Thy-1	Hs00264235_s1
CD31/PCAM-1	Hs01065279_m1
CD49a/ VLA1	Hs00168433_m1
CD29	Hs00559595_m1
Cyclophilin	4326316E

Western blot analysis

Total proteins from TAT and SAT were extracted by NE-PER Nuclear and Cytoplasmatic Extraction Reagents protocol (Pierce). Protein extracts (30 μg) were separated by SDS-PAGE, blotted onto a PVDF membrane and then incubated with specific antibodies (anti-VEGF-A SC-152, anti-VEGF-B SC8042, anti-VEGF-C SC25783, anti-VEGF-D SC 80447, anti-VEGF-R3/FLT4 (C-20) SC321, anti-VEGF-R2/FLK1 (A-3) SC6251, anti-VEGF-R1/FLT1 (C-17) SC316, anti-FABP4 SC271529 and anti-adipose-differentiation-related protein (ADRP) SC32888 from Santa Cruz

Table 1 Clinical and biological variables of patients

	Middle-aged (<i>n</i> =18)	Elderly (<i>n</i> =17)	<i>P</i>
Age (years)	45-65	≥70	
Glucose (mg/dL)	131.40±16.94	123.71±19.80	NS
Triglycerides (mg/dL)	132.50±16.30	121.29±17.54	NS
Values are presented as means ± SEM	Cholesterol (mg/dL)	146.33±9.01	NS
Relationships between both groups were analyzed using the Mann–Whitney <i>U</i> test	HDL-c (mg/dL)	32.67±2.43	NS
<i>BMI</i> body mass index, <i>HDL-c</i> high-density lipoprotein cholesterol, <i>LDL-c</i> low-density lipoprotein cholesterol	LDL-c (mg/dL)	95.00±5.54	NS
	Uric acid (mg/dL)	5.46±0.39	NS
	Creatinine (mg/dL)	1.00±0.10	NS
	Hb1Ac (%)	6.27±0.35	NS
	BMI (kg/m ²)	31.52±1.44	NS

Biotechnology). Anti-PPAR γ 2 MBS603559 was obtained from My Biosource. Protein signals were detected by electrochemiluminescence detection Quantity One[®] software (Bio-Rad Laboratories).

Isolation and expansion of cell derived stromal vascular fraction from human thymic fat and subcutaneous adipose tissue

Isolation and expansion of human cell derived stromal vascular fraction from adipose tissue was carried out using a procedure modified from Zuck et al. (2001). Briefly, adipose tissue samples were harvested from patients who underwent a coronary-artery bypass graft and transported in Hank's balanced salt solution supplemented with 3 % of penicillin and streptomycin. Adipose tissue biopsies were washed with PBS to remove cellular debris and dissected into small pieces with enzymatic digestion in a solution of 0.150 % collagenase type I and 1.0 % bovine serum albumin (BSA) for 1 h at 37°C on a shaking water bath.

Tissue suspension obtained from enzymatic digestion was centrifuged at 500×*g* for 10 min and floating adipocytes were separated from precipitated stromal vascular fraction by decanting, which was filtered through a 100- μ m mesh and centrifuged at 300×*g* for 5 min. The cell pellet was re-suspended in erythrocytes lysis buffer for 10 min at room temperature and, after further centrifuging at 300×*g* for 5 min, re-suspended in DMEM/F12 supplemented with 10 % fetal bovine serum, 100 μ g/mL streptomycin, 100 U/mL penicillin, 2 mM L-glutamine, and 1 μ g/mL of amphotericin B. Cells were plated in tissue culture flasks and incubated at 37°C in humid atmosphere with

5 % of CO₂ for approximately 7 days until 90 % confluence was reached.

Immunophenotype characterization by flow cytometry

Cultured stromal vascular fraction cells (passage zero and three) were characterized by flow cytometry according to a panel of cell surface markers, including Thy1/CD90, CD29, and CD49a (eBioscience). Briefly, 1×10⁶ cells/mL were re-suspended in a blocking buffer solution, containing PBS supplemented with BSA to 3.0 %, and incubated for 10 min on ice. Cells (1×10⁵) were aliquoted per polypropylene tube and according to the instructions of the manufacturer, 10 or 20 μ L of mouse antibody solution was added, against the respective cell surface markers, together with its corresponding fluorochrome (phycoerythrin [PE], fluorescein isothiocyanate, allophycocyanin, and phycoerythrin coupled to the cyanine dye Cy7 [PE-Cy7]). One of the tubes was destined for the marking of corresponding isotype controls. All tubes were incubated on ice and protected from light for 30 min. The cells were washed twice in a blocking buffer solution and finally re-suspended in 500 μ L of PBS for acquisition of 1×10⁴ events by tube through a CyAnTM cytometer ADP high-speed analyzer (Beckman Coulter).

Statistical analysis

The results are given as the mean ± standard error means (SEM). All clinical parameters are summarized by descriptive statistics. Relationships

between both groups (elderly and middle-aged) were analyzed using the Mann–Whitney *U* test. Correlation analysis was performed with Spearman's correlation coefficient test (*r*). Partial correlations for controlling for confounders (BMI, glucose, triglycerides, and cholesterol) were also performed. In all cases, the rejection level for a null hypothesis was $\alpha = 0.05$ for two tails. The statistical analysis was carried out with the SPSS software program (Version 15.0 for Windows; SPSS, Chicago, IL).

Results

Clinical and biological variables of both patient groups

Table 1 shows that there were no significant differences in clinical and biological variables between the two groups.

The comparisons of both TAT and SAT VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, and VEGF-D gene and protein expression levels between middle-aged adults and elderly cardiomyopathy ischemic patients.

qPCR analysis showed that TAT VEGF-A gene expression was significantly increased in elderly patients compared to the middle-aged group. In contrast, gene expression of VEGF-A in SAT was significantly decreased in elderly patients compared to middle-aged (Fig. 1a). Also, TAT VEGF-B gene expression was increased (not significantly) in elderly patients compared to middle-aged, while in SAT this expression was significantly decreased in elderly patients (Fig. 1b). VEGF-C and VEGF-D, which showed similar expression levels in both SAT and TAT in the middle age group, were significantly increased in elderly patients TAT, while in SAT the levels of these two isoforms were similar in both groups (Fig. 1c, d).

VEGF isoform protein expressions were also analyzed in both TAT and SAT from middle-aged and elderly patients. Figure 1e shows evidence of the presence of protein synthesis of the four VEGF isoforms in both TAT and SAT in all subjects. Protein analyses confirmed the results obtained by real-time PCR, clearly showing the increase of VEGF isoforms in TAT from elderly compared to middle-aged. While in SAT, protein levels of these isoforms were maintained similar or even decreased in elderly patients compared to middle-aged.

The comparisons of TAT and SAT endothelial marker gene and protein expression levels between middle-aged adults and elderly cardiomyopathy ischemic patients

All members of the VEGF family stimulate cellular responses by binding to tyrosine kinase receptors (the VEGFRs) on the cell surface. VEGF-R1 (Flt-1), VEGF-R2 (Flk-1/KDR), and VEGF-R3 (Flt-4) are known to mediate vasculogenesis (R1 and R2) and lymphangiogenesis (R3). Figure 2a, b, d show that VEGF-R1 and VEGF-R2 are highly expressed in TAT compared to SAT. Furthermore, expression levels of VEGF-R1 and VEGF-R2 in TAT were higher in elderly compared to middle-aged patients. In contrast, in SAT, expression levels of these two endothelial markers did not show any significant differences between elderly and middle-aged subjects. VEGF-R3 expression levels in TAT were similar in both elderly and middle-aged patients, while in SAT, the gene expression level of this receptor was significantly lower in elderly compared to middle-aged patients (Fig. 2c), even though no significant differences in protein expression were observed between the different groups and between TAT and SAT (Fig. 2d). It is well-known that the adhesive interactions between cells and the extracellular matrix take place to permit endothelial cell migration during angiogenesis. These interactions are mediated by integrins which bind to ligands in the ECM-promoting endothelial cell motility and proliferation. Here, we assessed whether the enhancement of angiogenic factor gene expression was accompanied by an increase in the expression of genes codifying for markers of endothelial progenitors cells controlling endothelial differentiation. Figure 3 shows that TAT CD90/Thy-1, CD31/PCAM-1, and CD29 gene expression levels were significantly increased in elderly patients compared to middle-aged patients, while these levels were decreased in the SAT of these individuals compared to middle-aged patients (Fig. 3a–c). VLA1/CD49a integrin alpha 1 chain, which is known to combine with beta1 subunit CD29 to form a receptor for collagen and laminin, was observed to be highly expressed at both age stages in TAT showing similar levels in the elderly and middle-aged, while the levels of this integrin were much lower in SAT compared to TAT, also, in SAT, these levels were diminished in elderly compared to middle-aged patients (Fig. 3d). To analyze

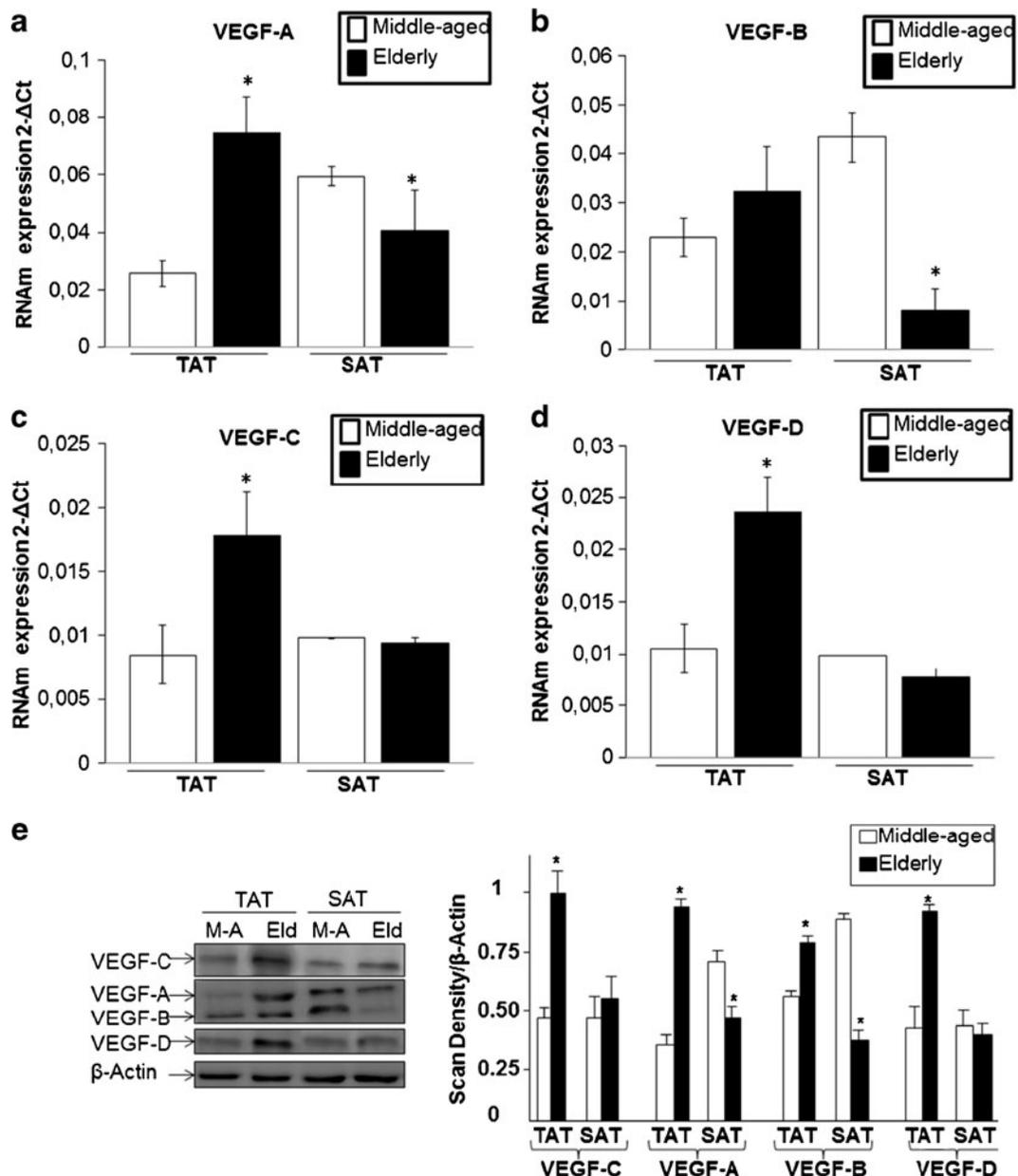


Fig. 1 VEGF isoforms mRNA gene and protein expression in thymus adipose tissue (*TAT*) and subcutaneous adipose tissue (*SAT*) from middle-aged and elderly cardiomyopathy subjects. **a–d** VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C and VEGF-D mRNA expression analysis was performed in *TAT* and *SAT* from two groups of middle-aged (45–65 years old, $n=18$) and elderly (70<years old, $n=17$) cardiomyopathy subjects. mRNAs were normalized to cyclophilin levels. Results were obtained from triplicate and expressed as the

mean \pm SEM. Relationships between both groups, elderly and middle-aged patients, were analyzed using the Mann–Whitney U test. * $p<0.05$. **e** Immunoblotting analysis of *VEGF* isoforms. The resulting blot of each isoform was compared to β -Actin constitutive protein. Density analysis was carried out by normalizing the samples to β -actin using NIH's Image-J software program. The blot is representative of three independent experiments with different samples, * $p<0.05$

whether gene expression differences were maintained in protein expression, endothelial marker

surface expression was analyzed by flow cytometry in stromal fraction of both adipose tissues. Table 2 shows

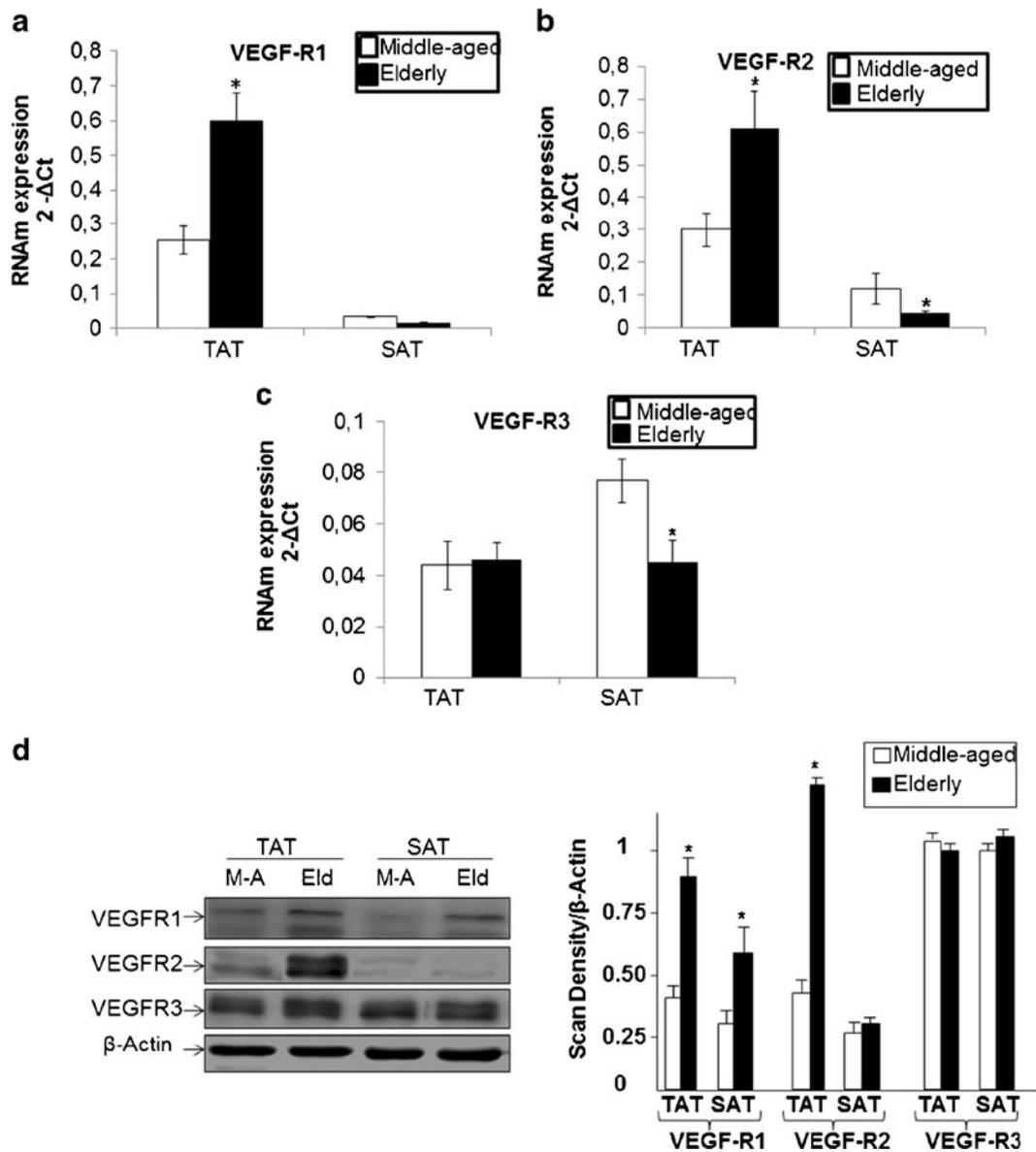


Fig. 2 Endothelial markers mRNA gene and protein expression in thymus adipose tissue (*TAT*) and subcutaneous adipose tissue (*SAT*) from middle-aged and elderly cardiomyopathy subjects. **a–c** Vascular endothelium growth factor receptors mRNA expression analysis was performed in *TAT* and *SAT* from two groups of middle-aged (45–65 years old, $n=18$) and elderly (>70 years old, $n=17$) cardiomyopathy subjects. mRNAs were normalized to cyclophilin levels. Results were obtained from triplicate and expressed as the mean \pm SEM. Relationships

between both groups, elderly (*Eld*) and middle-aged (*M-A*) patients, were analyzed using the Mann-Whitney U test. * $P < 0.05$. Immunoblotting analysis of *VEGF-R1*, *VEGF-R2*, and *VEGF-R3*. The resulting blot of each isoform was compared to β -Actin constitutive protein. Density analysis was carried out by normalizing the samples to β -Actin using NIH's Image-J software program. The blot is representative of three independent experiments with different samples, * $p < 0.05$

that Thy1/CD90, CD29, and CD49a/VLA1 surface marker expression was increased in *TAT* from elderly patients compared to middle-aged, while in *SAT*, surface expression of these markers decreased in the elderly

compared to middle-aged group. In *TAT*, the differences observed in Thy1/CD90 and CD49a/VLA1 surface expression was significant, while the differences observed in CD29 expression were not.

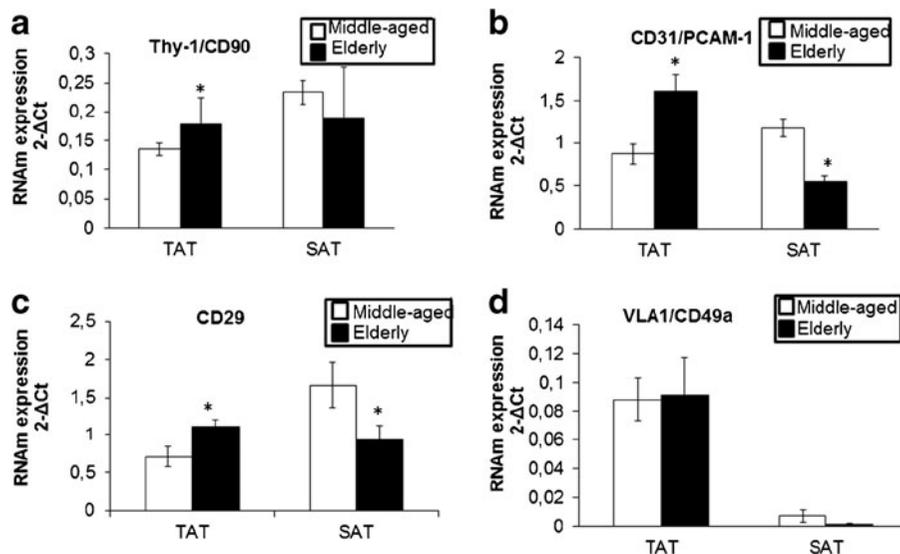


Fig. 3 Integrin markers mRNA gene expression in thymus adipose tissue (TAT) and subcutaneous adipose tissue (SAT) from middle-aged and elderly cardiomyopathy subjects. **a–d** integrin markers (Thy1/CD90, CD29, and VLA1/CD49a) mRNAs expression analysis was performed in TAT and SAT from two groups of middle-aged (M-A) (45–65 years old, $n=18$)

and elderly (Eld) (>70 years old, $n=17$) cardiomyopathy subjects. mRNAs were normalized to cyclophilin levels. Results were obtained from triplicate and expressed as the mean \pm SEM. Relationships between both groups, elderly and middle-aged patients, were analyzed using the Mann–Whitney U test. * $p < 0.05$

The comparisons of TAT and SAT adipogenic gene and protein expression levels (PPAR γ 2, ADRP, and FABP4) between middle-aged adults and elderly cardiomyopathy ischemic patients

qPCR analysis showed that PPAR γ 2, ADRP, and FABP4 gene expression levels were significantly increased in elderly patient TAT compared to the levels observed in middle-aged TAT, while in SAT these levels were maintained or slightly diminished

(Fig. 4a–c). Western blotting analysis showed that even protein levels of PPAR γ 2 and ADRP were elevated in SAT from middle-aged subjects compared to TAT; these levels were significantly decreased in SAT from elderly compared to middle-aged, while in TAT the levels of these two adipogenic markers were increased in elderly subjects. FABP4 protein levels in middle-aged patients were higher in SAT than in TAT, but in elderly subjects these levels were significantly increased in TAT

Table 2 Flow cytometry analysis to quantify endothelial markers, Thy1/CD90, CD29, and CD49a/VLA1, cell-surface expression in stromal vascular fraction from both TAT and SAT from middle-aged and elderly cardiomyopathy subjects

	TAT		SAT	
	Middle-aged ($n=6$)	Elderly ($n=6$)	Middle-aged ($n=6$)	Elderly ($n=6$)
Thy1/CD90	90.95 \pm 2.31	97.78 \pm 3.35*	95.25 \pm 9.41	83.95 \pm 7.41*
CD29	96.31 \pm 2.56	98.15 \pm 6.91	97.17 \pm 6.43	85.35 \pm 13.65*
CD49a/VLA1	48.02 \pm 5.21	53.95 \pm 1.49*	26.02 \pm 1.85	21.85 \pm 2.95

Stromal vascular fraction cells were prepared for flow cytometry as described in “Material and methods”. Data represent the percentage of cell staining for cellular surface markers from stromal vascular fractions from both subcutaneous (SAT) and thymus (TAT) adipose tissues. Values presented in the table depict average \pm SEM of three independent experiments. Relationships between both groups, elderly and middle-aged patients, were analyzed using the Mann–Whitney U test * $p < 0.05$

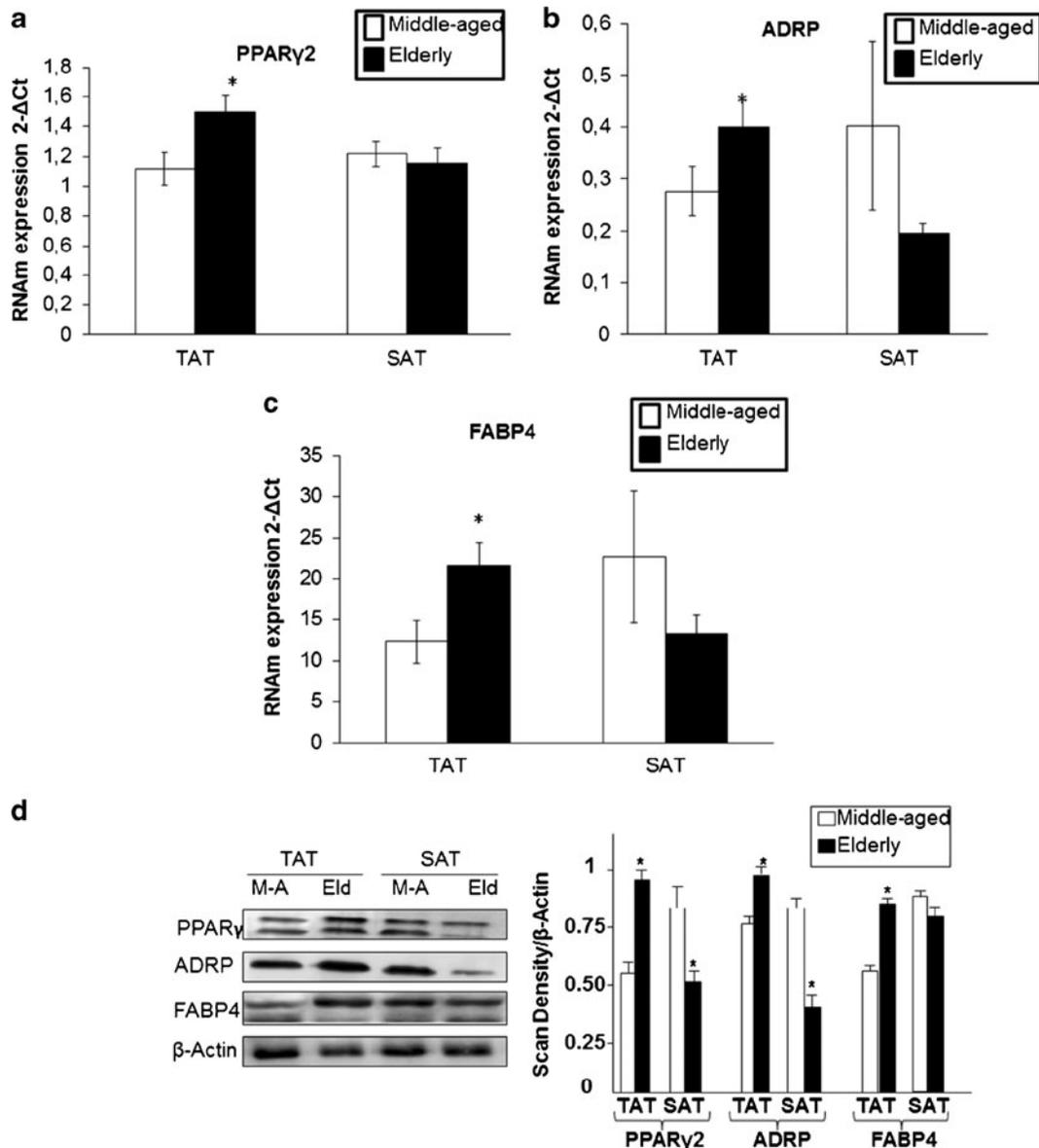


Fig. 4 Adipogenic markers, PPAR γ , ADRP, and FABP-4 mRNA gene and protein expression in thymus adipose tissue (TAT) and subcutaneous adipose tissue (SAT) from middle-aged and elderly cardiomyopathy subjects. **a–c** PPAR γ , ADRP, and FABP-4 mRNA expression analysis was performed in TAT and SAT from two groups of middle-aged (M-A) (45–65 years old, $n=18$) and elderly (Eld) (>70 years old, $n=17$) cardiomyopathy subjects. mRNAs were normalized to cyclophilin levels. Results were obtained from triplicate and expressed as the mean \pm SEM.

Relationships between both groups, elderly and middle-aged patients, were analyzed using the Mann–Whitney U test. * $p < 0.05$. **d** Immunoblotting analysis of PPAR γ , ADRP, and FABP-4. The resulting blot of each isoform was compared to β -Actin constitutive protein. Density analysis was carried out by normalizing the samples to β -Actin using NIH's Image-J software program. The blot is representative of three independent experiments with different samples, * $p < 0.05$

reaching the levels detected in SAT, where protein levels of this adipogenic marker were maintained

similar in middle-aged and elderly patients (Fig. 4d).

Correlative analysis

Correlative analysis of cardiomyopathy ischemic patients age and angiogenic markers gene expression in TAT showed a strong positive and significant correlation between these parameters, especially CD31, VEGF-A, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-R1, VEGF-R2, and VEGF-R3 which were highly correlated with age (Table 3). Next, partial correlation analysis was used to determine the strength of the association of these angiogenic markers gene expression levels in TAT with age, after controlling for other clinical covariates including glucose, BMI, triglyceride, and cholesterol (Table 4). Partial correlation analysis showed that expression levels of CD31, VEGF-R1, VEGF-R2, VEGF-A, and VEGF-C were independently correlated with age, indicating that this significant association was not mediated by glucose, BMI, triglycerides, or cholesterol. However, the correlations of VEGF-R3 and VEGF-D with age were eliminated when glucose, BMI, triglycerides and cholesterol were controlled.

Moreover, when we analyzed the correlation between adipogenic (PPAR γ 2, FABP-4, and ADRP) and angiogenic (VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-R1, VEGF-R2, and VEGF-R3) markers in TAT, we observed strong positive correlations between these parameters (Table 5), while in subcutaneous adipose tissue these correlations were negative (data not shown).

Discussion

Currently, subcutaneous and visceral adipose tissues are the most suitable sources of angiogenic factors on offer (Rehman et al. 2004) and an appropriate candidate for tissue engineering and neovascularization (Kondo et al. 2009). However, recently,

Table 3 Analysis of correlation between the expression of angiogenic markers in TAT and age of cardiomyopathy ischemic patients

	Age (<i>r</i>)
CD31	0.446**
VEGF-A	0.469**
VEGF-C	0.339*
VEGF-D	0.397*
VEGF-R1	0.504**
VEGF-R2	0.463**
VEGF-R3	0.372*

Correlations were determined by Spearman's correlation coefficient test

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

most investigations indicate that aging seriously impairs the angiogenic properties of these adipose tissues (El-Ftesi et al. 2009; Efimenko et al. 2011). Even so, and because of ease of access, these adipose tissues remain the most suitable source of angiogenic factors and progenitor cells with a potential to improve neovascularization of ischemic tissues (Efimenko et al. 2011).

In this work and for the first time, we offer an attractive new source of adipose tissue and angiogenic factors, the adult thymus adipose tissue, which does not appear to impair its angiogenic properties with ageing; on the contrary these characteristics are significantly increased with aging.

To our knowledge, this is the first report that shows that in elderly cardiomyopathy ischemic subjects, whereas the expression levels of angiogenic and endothelial markers declined in subcutaneous adipose tissue, thymus fat showed an increase in gene expression of these parameters in comparison with middle-aged subjects. Likewise, adipogenic marker gene expression showed an increase in TAT from elderly subjects compared to middle-aged, while in SAT they showed a decrease. Moreover, in TAT, expression levels of CD31, VEGF-A, VEGF-C, VEGF-R1, and VEGF-R2 correlated significantly and positively with age independently of any confounder clinical covariates, including BMI, glucose, cholesterol and triglycerides. Interestingly, the associations of VEGF-D and VEGF-R3 with age were eliminated when controlling BMI, glucose, cholesterol, and triglycerides, suggesting that these clinical parameters have confounding effects on lymphangiogenic parameters, while angiogenic factors seem to be independent of these clinical covariates in TAT from these patients. On the other hand, in subcutaneous adipose tissue the correlations between all these angiogenic markers and age were negative. These latest data confirmed previous data showing that aging impairs angiogenesis and decreases expression levels of several angiogenic factors (El-Ftesi et al. 2009; Efimenko et al. 2011; Arthur et al. 1998b). In fact, it has been shown that adipose tissue angiogenic function is impaired in elderly subjects, suggesting that this decline may impair the use of adipose tissue as a source of autologous endothelial progenitor cells, potentially useful for cardiovascular repair in elderly patients (Madonna et al. 2011). Other studies carried out on rodents have shown that aged mice adipose tissue stem cells displayed decreased

Table 4 Partial correlations between the expression of angiogenic markers in TAT, from cardiomyopathy ischemic patients, and age controlling for glucose, triglycerides, BMI, and cholesterol

Confounders covariates	Glucose	Triglycerides	BMI	Cholesterol
	Age (<i>r</i>)			
CD31	0.647*	0.672**	0.448**	0.639*
VEGF-R1	0.727***	0.588**	0.529***	0.607*
VEGF-R2	0.678***	0.526**	0.482**	0.522**
VEGF-A	0.698**	0.529*	0.512**	0.525**
VEGF-C	0.574*	0.578*	0.395*	0.650*

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p \leq 0.005$

angiogenic properties compared to adipose tissue stem cells from younger mice (Efimenko et al. 2011).

We recently showed that the VEGF isoform most expressed in TAT is VEGF-A and VEGF-B compared to other isoforms of these angiogenic factors (VEGF-C, VEGF-D, etc.) (Tinahones et al. 2009). These angiogenic factors are key regulators of angiogenesis and vasculogenesis (Oosthuysen et al. 2001; Carmeliet et al. 1996). In the present study, we observed that TAT, despite having lower expression levels in middle-aged subjects compared to SAT of VEGF-A and VEGF-B, these two angiogenic factors increased significantly in TAT from elderly subjects while in SAT this factor showed a clear and significant decrease. Moreover, whereas in SAT, VEGF-C, and VEGF-D expression levels did not show any difference with aging, TAT showed a clear increase in

elderly subjects compared to the middle-aged. Both isoforms are known to play a pivotal role in the rise of lymphangiogenesis (Karkkainen et al. 2004; Stacker et al. 2001). Besides, when analyzing endothelial marker gene expression, similar profiles, such as angiogenic factors, were observed showing a noticeable and significant increase of these parameters in TAT from elderly subjects while in SAT these levels were drastically or highly decreased. Additionally, most of the angiogenic and endothelial marker gene expression levels showed positive and significant correlation with age in TAT. All together, these data visibly indicate that in elderly subjects, TAT thymus fat is a promising and attractive source of angiogenic activity compared to subcutaneous adipose tissue.

In reality, age involution of the adult human thymus would consist of the replacement of its immunogenic

Table 5 Correlation analysis of angiogenic and adipogenic marker gene expression in cardiomyopathy ischemic TAT

(<i>r</i>)	VEGF-R1	VEGF-R2	VEGF-R3	PPAR γ 2	ADRP	FABP4	CD31
VEGF-A	0.955**	0.979**		0.456**	0.653**	0.744**	0.393*
VEGF-B				0.392*	0.306*	0.395*	
VEGF-C		0.320*		0.385*	0.389*	0.364*	0.371*
VEGF-D	0.461**		0.522**	0.338*	0.574***	0.565**	
VEGF-R1				0.386*			0.459**
VEGF-R2				0.417*		0.282*	
VEGF-R3							0.419*
PPAR γ 2	0.386*	0.417*					
FABP4							0.327*
ADRP							0.380*

Correlations were determined by Spearman's correlation coefficient test

ADRP adipose differentiation-related protein, FABP-4 fatty acid-binding protein 4, PPAR γ 2 peroxisome proliferator-activated receptor gamma2, VEGF vascular endothelial growth factor, VEGF-R vascular endothelial growth factor receptor

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P \leq 0.005$

composition by adipose tissue. This fact is obviously appreciated by the increase of adipose thymus mass throughout life. This consideration could be corroborated here by the analysis of adipogenic factors which showed a significant increase of gene and protein expression of these parameters in TAT from elderly subjects, while in SAT, these markers showed a significant decrease remaining at lower levels than those detected in elderly TAT. Moreover, the fact that angiogenic factors showed significant strong positive correlations with adipogenic markers, leads us to believe that the increase of angiogenic properties could be due to the increase of adipose mass throughout life, as it is well-known that angiogenesis is linked to adipogenesis (Cao 2007).

Finally, one could wonder why thymus adipose tissue should be of interest as an angiogenic source, in view of easy access to other body adipose tissues such as subcutaneous. As we mentioned above, cardiovascular disease and age increase impairs angiogenic properties of adipose tissues, including subcutaneous and visceral, which make them insufficient candidates for angiogenic therapies and for neovascularization of ischemic tissues (El-Ftesi et al. 2009). Thymus fat could be an attractive and promising candidate for these therapies. To note that the largest sources of thymus adipose tissue are ischemic patients, which in the great majority are usually over the age of 60. Part of this tissue used to be discarded in aortic cannulation procedures of the ascending aorta in cardiovascular surgery in patients in need of a CPB (Rathore et al. 2009; Pacifico et al. 1986). Taking into account all data obtained in this study, we believe that thymus fat is slowly becoming of interest as the most appropriate source of angiogenic factors and probably endothelial progenitor cells, which leads us to consider motivating the study for its potential use in the regeneration of new vessels, especially in cardiomyopathy ischemic patients. These considerations may seem speculative, but we have faith that characterizing thymus adipose tissue-derived stromal cell population and endothelial progenitor cells in this adipose tissue, besides the ability of these endothelial cells to improve neovascularization, would clarify all these concerns and would establish whether this fat could have a relevant role in regenerative medicine.

Acknowledgments This work was supported by grants from the Spanish Ministry of Health (FIS) [PS09/00997 and PI10/01947], and from the Consejería de Innovación (CTS04369). Rajaa El Bekay is recipient of a post-doctoral “Miguel Servet” grant (FIS-2007) [CP07/00288] from the Spanish Ministry of

Health. M. Murri is a recipient of post doctoral Fellowship CD11/00305 Sara Borrell from Spanish Ministry of Health. CIBERobn is an initiative of the ISCIII (Instituto de Salud Carlos III), Spain. The authors thank technician Juan Alcaide for his technical support in developing our laboratory techniques, and D.W.E. Ramsden for the English manuscript revision. The authors also thank the cardiovascular surgery service of the Carlos Haya Hospital of Malaga.

References

- Arthur WT, Vernon RB, Sage EH, Reed MJ (1998) Growth factors reverse the impaired sprouting of microvessels from aged mice. *Microvasc Res* 55:260–270
- Asano A, Irie Y, Saito M (2001) Isoform-specific regulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) family mRNA expression in cultured mouse brown adipocytes. *Mol Cell Endocrinol* 174(1–2):71–76
- Cao Y (2007) Angiogenesis modulates adipogenesis and obesity. *J Clin Invest* 117:2362–2368
- Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, Pollefeys S, Kieckens L et al (1996) Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* 380:435–439
- Dvorak HF, Feng D, Brown LF, Dvorak AM (1999) Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor and the significance of microvascular hyperpermeability in angiogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol* 237:97–132
- Efimenko A, Starostina E, Kalinina N, Stolzing A (2011) Angiogenic properties of aged adipose derived mesenchymal stem cells after hypoxic conditioning. *J Transl Med* 18:9–10
- El-Ftesi S, Chang EI, Longaker MT, Gurtner GC (2009) Aging and diabetes impair the neovascular potential of adipose-derived stromal cells. *Plast Reconstr Surg* 123(2):475–485
- Ferrara N, Carver-Moore K, Chen H, Dowd M, Lu L et al (1996) Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature* 380(6573):439–442
- Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J (2003) The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 9(6):669–676
- Hale LP (2004) Histologic and molecular assessment of human thymus. *Ann Diagn Pathol* 8:50–60
- Heiss C, Keymel S, Niesler U, Ziemann J, Kelm M, Kalka C (2005) Impaired progenitor cell activity in age-related endothelial dysfunction. *J Am Coll Cardiol* 45:1441–8
- Karkkainen MJ, Haiko P, Sainio K, Partanen J, Taipale J, Petrova TV, Jeltsch M, Jackson DG, Talikka M, Rauvala H, Betsholtz C, Alitalo K (2004) Vascular endothelial growth factor C is required for sprouting of the first lymphatic vessels from embryonic veins. *Nat Immunol* 5:74–80
- Kondo K, Shintani S, Shibata R, Murakami H, Murakami R, Imai-zumi M, Kitagawa Y, Murohara T (2009) Implantation of adipose-derived regenerative cells enhances ischemia-induced angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29(1):61–66
- Madonna R, Renna FV, Cellini C, Cotellese R, Picardi N, Francomano F, Innocenti P, De Caterina R (2011) Age-dependent impairment of number and angiogenic potential of adipose tissue-derived progenitor cells. *Eur J Clin Invest* 41(2):126–133. doi:10.1111/j.1365-2362.2010.02384.x

- Miranville A, Heeschen C, Sengenès C, Curat CA, Busse R, Bouloumie A (2004) Improvement of postnatal neovascularization by human adipose tissue-derived stem cells. *Circ* 110:349
- Moon MH, Kim SY, Kim YJ et al (2006) Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells improve postnatal neovascularization in a mouse model of hindlimb ischemia. *Cell Physiol Biochem* 17:279
- Oosthuysen B, Moons L, Storkebaum E, Beck H, Nuyens D, Brusselmans K et al (2001) Deletion of the hypoxia-response element in the vascular endothelial growth factor promoter causes motor neuron degeneration. *Nat Genet* 28:131–138
- Pacifico AD, Sears NJ, Burgos C (1986) Harvesting, routing, and anastomosing the left internal mammary artery graft. *Ann Thorac Surg* 42:708–710
- Rathore KS, Edwards J, Stuklis R (2009) “Pulmonary slit” procedure for preventing tension on the left internal thoracic artery graft. *Tex Heart Inst J* 36:131–133
- Rehman J, Traktuev D, Li J, Merfeld-Clauss S, Temm-Grove CJ, Bovenkerk JE, Pell CL, Johnstone BH, Conside RV, March KL (2004) Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. *Circ* 109 (10):1292–1298
- Saiki A, Watanabe F, Murano T, Miyashita Y, Shirai K (2006) Hepatocyte growth factor secreted by cultured adipocytes promotes tube formation of vascular endothelial cells in vitro. *Int J Obes (Lond)* 30(11):1676–84
- Salas J, Montiel M, Jiménez E, Valenzuela M, Valderrama JF, Castillo R, González S, El BR (2009) Angiogenic properties of adult human thymus fat. *Cell Tissue Res* 338:313–318
- Serini G, Napione L, Arese M, Bussolino F (2008) Besides adhesion: new perspectives of integrin functions in angiogenesis. *Cardiovasc Res* 78:213–222
- Sosman JA, Mier JW (2003) Biological drug duo delivers one-two tumor punch. *Nat Med* 9(6):649–650
- Stacker SA, Caesar C, Baldwin ME, Thornton GE, Williams RA et al (2001) VEGF-D promotes the metastatic spread of tumor cells via the lymphatics. *Nat Med* 7:186–189
- Tinahones F, Salas J, Mayas MD, Ruiz-Villalba A, Macias-Gonzalez M et al (2009) VEGF gene expression in adult human thymus fat: a correlative study with hypoxic induced factor and cyclooxygenase-2. *PLoS ONE* 4(12): e8213
- Wang S, Li X, Parra M, Verdin E, Bassel-Duby R et al (2008) Control of endothelial cell proliferation and migration by VEGF signaling to histone deacetylase 7. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(22):7738–7743
- Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang JI et al (2001) Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 7:211–226