

Original / Investigación

EXPERIMENTAL

Identificación y caracterización de células madre hematopoyéticas en tejido adiposo obtenidas por nanograsa

Identification and characterization of hematopoietic stem cells in adipose tissue obtained by nanofat



Tamayo Carbón A.M.

Alicia María TAMAYO CARBÓN*, Arturo CHANG MONTEAGUDO**, Elizabeth HERNÁNDEZ RAMOS***, Susel QUESADA PEÑA****, Diana Katherine CUASTUMAL FIGUEROA*****

Resumen

Abstract

Introducción y objetivo. La obtención y aplicación de células madre adiposas como opción de terapia regenerativa requiere demostrar su presencia y su caracterización individual según aspectos biológicos personalizados.

El objetivo del presente estudio es identificar y caracterizar la presencia de células madre hematopoyéticas del tejido adiposo obtenidas por nanograsa.

Material y método. Estudio descriptivo transversal con 88 pacientes a los que se les realizó liposucción para obtención, fractura, emulsión y filtración del tejido adiposo por método mecánico de nanograsa en el Servicio de Cirugía Plástica y Caumatología del Hospital Hermanos Ameijeiras de La Habana, Cuba, entre febrero de 2020 y febrero de 2023.

La muestra fue analizada por citometría de flujo en el Instituto de Hematología e Inmunología de la ciudad para demostrar la presencia de las células madre hematopoyéticas y diferenciarlas.

Resultados. La edad promedio de los pacientes fue de 46 años, el 92% mujeres y el 80.7% sanos. En igual porcentaje se presentaron pacientes con cáncer, quemaduras, zonas cruentas e hipertensión arterial (3.4%). La media del índice de masa corporal (IMC) fue 26.6 kg/m². La región abdominal fue la más abordada (72.7%). Se identificaron con expresión de marcaje positivo las células CD34. La media de CD34+ viables fue 5.8; la media de las células madre viables fue discretamente superior en los pacientes con edad igual o superior a 60 años; el porcentaje medio de células madre viables fue superior en los pacientes sanos; en aquellos que tenían un adecuado IMC se constató un valor medio superior respecto a los pacientes con sobrepeso y obesidad; no se encontraron diferencias significativas entre estas variables.

Conclusiones. En nuestro estudio, las células madre hematopoyéticas en el tejido adiposo obtenido por nanograsa presentaron una concentración relativa diferente según las condiciones biológicas del donante. Observamos mayor número de células madre en pacientes mayores de 50 años, sin patologías asociadas y cuya zona donante fue la abdominal, lo que puede sentar las bases para próximas investigaciones teniendo en cuenta que las células madre pueden purificarse, cultivarse y diferenciarse según los diferentes linajes y almacenarse para futuras cosechas de exosomas.

Background and objective. Obtaining and applying adipose stem cells as a regenerative therapy option requires demonstrating their presence and their individual characterization according to personalized biological aspects.

Our aim is to identify and characterize the presence of hematopoietic stem cells from adipose tissue obtained by nanofat.

Methods. Descriptive cross-sectional study with 88 patients who underwent liposuction to obtain, fracture, emulsify and filter adipose tissue by mechanical nanofat method in the Plastic Surgery and Caumatology Service of the Hospital Ameijeiras, Havana, Cuba, between February 2020 and February 2023. The sample was analyzed by flow cytometry at the Hematology and Immunology Institute of the city to demonstrate the presence of hematopoietic stem cells and differentiate them.

Results. The average age of the patients was 46 years, 92% were female, and 80.7% were healthy. The same percentage of patients with cancer, burns, bloody areas and high blood pressure (3.4%) were presented. The mean body mass index (BMI) was 26.6 kg/m², and the abdominal region was the most frequently treated donor area (72.7%). CD34 cells were identified with positive labeling expression. The mean number of viable CD34+ cells was 5.8; the mean number of viable stem cells was slightly higher in patients aged 60 years or older; the mean percentage of viable stem cells was higher in healthy patients; in those with an adequate BMI, a higher mean value was found compared to overweight and obese patients; no significant differences were found between these variables.

Conclusions. In our study, hematopoietic stem cells in adipose tissue obtained by nanofat presented a different relative concentration depending on the biological conditions of the donor. A higher number of stem cells was observed in patients over 50 years of age, without associated pathologies and whose donor area was the abdominal region, which can lay the foundations for future research studies, taking into account that stem cells can be purified, cultured and differentiated according to different lineages and stored for future exosome harvests.

Palabras clave Células madre, Citometría de flujo, Tejido adiposo, Nanograsa, Fracción vascular estromal, Terapia regenerativa.

Nivel de evidencia científica 5c Terapéutico
Recibido (esta versión) 20 junio / 2024
Aceptado 28 noviembre / 2024

Key words Stem cells, Flow cytometry, Adipose tissue, Nanofat, Stromal vascular fraction, Regenerative therapy.

Level of evidence 5c Therapeutic
Received (this version) June 20 / 2024
Accepted November 24 / 2024

Conflicto de intereses: Los autores declaran no tener ningún interés financiero relacionado con el contenido de este artículo.
Financiación: No hubo fuentes externas de financiación para este trabajo.

* Cirujano Plástico, Profesora e investigadora titular, Jefe deL Servicio de Cirugía Plástica y Caumatología, Hospital Clínico Quirúrgico Hermanos Ameijeiras, La Habana, Cuba.

** Especialista en Inmunología, Instituto de Hematología e Inmunología, La Habana, Cuba.

*** Licenciada en Bioquímica y Biología Molecular, Instituto de Hematología e Inmunología, La Habana, Cuba.

**** Especialista en Bioestadística, Profesora Auxiliar e Investigadora Agregada, Departamento de Investigaciones, Hospital Clínico Quirúrgico Hermanos Ameijeiras, La Habana, Cuba.

***** Cirujano Plástico, Hospital Clínico Quirúrgico Hermanos Ameijeiras, La Habana, Cuba.

Introducción

El tejido adiposo es una de las principales fuentes de células madre de fácil obtención y con alto potencial de diferenciación hacia linajes especializados; se puede utilizar para la obtención de células progenitoras obteniendo tejido adiposo procedente de liposucción y de abdominoplastia al que se le pueden aplicar métodos de disgregación mecánica y enzimática, aunque para algunos autores los mejores resultados se obtienen del procesamiento del lipoaspirado y la disgregación enzimática. Este procesamiento tiene un costo elevado, requiere mucho tiempo y no tiene un protocolo operativo común y reproducible, además de que destruye las glucoproteínas que rodean las células madre derivadas del tejido adiposo (por sus siglas en inglés ASC- *Adipose Stromal Cells*) por la digestión de la matriz extracelular.^(1,2)

La disrupción mecánica para obtención de nanograsa (*nanofat*), además de ser un método rápido, aporta una población de células estromales organizadas como agregados celulares que permanecen unidas a la matriz celular nativa, lo que mantiene la viabilidad celular y garantiza una respuesta mejorada a la proliferación y diferenciación en comparación con las células aisladas.⁽³⁾

La célula principal en mayor concentración es el adipocito, y el resto está compuesto por diferentes tipos celulares que constituyen la fracción vascular estromal (por sus siglas en inglés SFV- *Stromal Vascular Factor*), la cual es una porción de tejido adiposo en la que reside una enorme población de células pluripotenciales mesenquimales, encontrando células del tejido conectivo localizadas alrededor del árbol vascular, entre ellas, células madre adultas (CMA).⁽¹⁾

Uno de los componentes que ha adquirido mayor relevancia en los últimos años es la SFV, que a su vez incluye células vasculares, sanguíneas y precursoras de adipocitos. Los pericitos, junto con las células endoteliales y las musculares lisas, forman la vasculatura del tejido adiposo. Los macrófagos tienen un papel muy importante en la adquisición del estado proinflamatorio crónico. Estas poblaciones celulares son las encargadas de mantener la renovación de la población de adipocitos en condiciones fisiológicas.⁽⁴⁾ Dentro de las células madre se describen los marcadores progenitores CD105, CD117, CD13, CD73, CD90, poblaciones periciticas CD146, células de origen hematopoyético exceptuando glóbulos rojos CD45, células endoteliales y sus progenitores CD31, glóbulos rojos CD235a, células madre hematopoyéticas, del estroma y células endoteliales CD34. Todas ellas con las características comunes de autorrenovación, indiferenciación y derivación a células maduras, constituyen el dominio

individual para regenerar las células senescentes.⁽⁵⁾

El fenotipo de superficie de estas células es homogéneo y similar al descrito para las células de la médula ósea. Por citometría de flujo expresan marcaje positivo para: CD9, CD10, CD13, CD29, CD44, CD54, CD90, CD105, HLA clase I, mientras que son negativas para: CD34, CD45, CD116, CD14, CD31 y HLA clase II. El CD106 es el principal marcador que diferencia a las células obtenidas de la médula ósea y las ASC. Al igual que las células madre mesenquimales (CMM) procedentes de la médula ósea, las ASC se consideran inmunoprivilegiadas no solo por carecer de antígenos HLA clase II, sino también por su habilidad para suprimir la reacción linfocítica mixta, por lo que se pueden injertar de forma alogénica.⁽⁵⁾

El control de la autorrenovación y diferenciación de las mismas está regulado por mecanismos extrínsecos e intrínsecos que pudieran estar influenciados por la edad, el índice de masa corporal (IMC) y las enfermedades asociadas. Hasta donde hemos podido revisar, no hemos encontrado investigaciones que relacionen o asocien de alguna manera las características del sujeto donante con el número de ASC reportado por citometría de flujo. Es por ello que llevamos a cabo la presente investigación con el objetivo de identificar y caracterizar la presencia de células madre hematopoyéticas derivadas del tejido adiposo obtenidas por nanograsa.

Material y método

Estudio descriptivo transversal con datos recogidos de forma prospectiva en el periodo comprendido entre febrero de 2020 e igual mes de 2023 en el Servicio de Cirugía Plástica y Caumatología del Hospital Clínico Quirúrgico Hermanos Ameijeiras de La Habana, Cuba.

El universo del estudio quedó constituido por todos los pacientes a los que se les realizó liposucción con fines estéticos o reconstructivos en el periodo de estudio. Los criterios de inclusión fueron: pacientes mayores de 19 años de edad, de ambos sexos y que con consentimiento informado, dieron su anuencia para formar parte de la investigación. Los criterios de exclusión fueron: antecedentes de cáncer que no hayan recibido quimioterapia, embarazo o lactancia, trastornos psiquiátricos, enfermedades agudas o crónicas descompensadas, propensión a la formación de queloides, infección cutánea o sistémica, y tratamiento anticoagulante, antifibrinolíticos, antiinflamatorio no esteroideo, corticoesteroides o inmunosupresor.

Todos los procedimientos de liposucción se realizaron en régimen ambulatorio y bajo anestesia local.

Para la intervención quirúrgica se infiltró la zona a liposucciar con solución de Klein modificada y se llevó a cabo liposucción manual con técnica superhúmeda mediante cánula de aspiración de 3 mm y jeringuilla de 20 cc. Se decantó el tejido obtenido durante 10 minutos, desechando por gravedad el infranadante constituido por restos hemáticos y anestésicos; el supranadante se fracturó hasta emulsionar la grasa con transfer de 0.7mm, 1mm, 1.5 mm, 2.5 mm (de mayor a menor diámetro) y como último paso se filtró mediante rejilla de nanograsa para desagregar las ASC.

La muestra obtenida se envió junto con los datos de la planilla de recolección al Instituto de Hematología e Inmunología (previo convenio de colaboración conjunta entre ambos hospitales) para la determinación y caracterización de células madre hematopoyéticas por citometría de flujo. La medición de células se realizó mediante los métodos de inmunología en muestras de tejido adiposo procesado por nanograsa descritos a continuación:

La identificación de células madre hematopoyéticas CD34+, CD45+ y CD34+/CD45+, donde CD45+: estirpe hematopoyética; antígeno leucocitario común, excepto glóbulos rojos y CD34+: células progenitoras hematopoyéticas, del estroma y endoteliales. Se realizó la determinación utilizando un citómetro de flujo MACSQuant 10 (Milteny[®], Alemania). Las muestras obtenidas por este método no enzimático se tiñeron simultáneamente con anticuerpos monoclonales PE-CD34 y FITC-CD45. Además, se utilizó yoduro de propidio (IP) como sonda fluorescente específica de ADN para precisar la viabilidad celular. Dicha combinación de marcadores fluorescentes permitió identificar con precisión las células CD34+/CD45+ viables contenidas en el producto emulsionado. La adquisición celular se detuvo cuando se recogieron 10.000 eventos de células viables y la fluorescencia de FITC, PE y IP registró en una escala logarítmica con la finalidad de identificar y cuantificar la presencia de células progenitoras humanas CD34+/CD45+ y CD34+/CD45- (Fig. 1).

Los datos se registraron en las planillas de recolección de la información y se almacenaron en una base de datos Microsoft Excel para su procesamiento y análisis estadístico.

Las fuentes de información fueron la entrevista al paciente, las mediciones antropométricas y de citometría de flujo realizadas y la historia clínica, en caso necesario. El investigador principal fue el responsable de llenar la documentación a lo largo de todo el estudio, con el máximo de calidad y fidelidad de la información. Toda la información se revisó y clasificó para ser sometida después a las distintas etapas de análisis estadísticos.

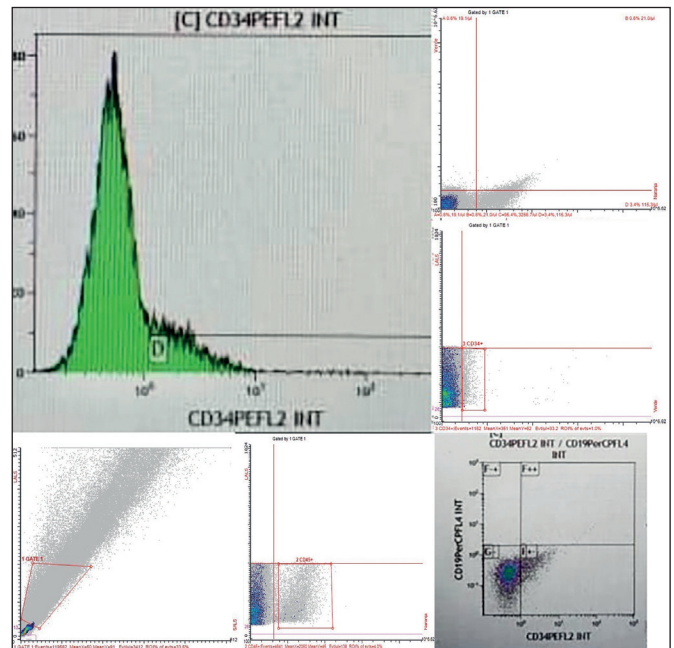


Figura 1. Identificación de células madre por citometría de flujo a partir de fluorocromos de isotiocianato de fluoresceína (FITC) y ficoeritrina (PE) que se acoplan a los monoclonales antiCD34 y antiCD45, las cuales se excitan con láser azul y PE emite luces naranjas y FITC verdes. La identificación se realiza por las características de dispersión frontal de la luz (forward scatter) y lateral (side scatter).

El procesamiento de los datos se realizó mediante el programa estadístico SPSS versión 20.0. Se caracterizó la muestra según la descripción de todas las variables: las cualitativas se resumieron en números absolutos y porcentajes; las cuantitativas en media y desviación estándar o mediana y rango intercuartílico, según distribución normal o no de los datos. Para detectar diferencias significativas en la expresión celular según grupos de edad, antecedentes y estado nutricional, se utilizó la prueba U de Mann-Whitney. Para este análisis se reagruparon las variables: la variable edad en menor de 60 años y 60 años y más; la variable antecedentes en no y sí; y la variable estado nutricional en normopeso y sobrepeso/obesidad. Se utilizó el nivel de significación $\alpha = 0.05$ en todas las pruebas de hipótesis. Los resultados se presentan en tablas.

Se procedió a comparar los resultados con la literatura existente: ensayos clínicos o estudios descriptivos o de otro tipo publicados. Se discutieron los hallazgos en base a los objetivos planteados. Finalmente se verificaron las coincidencias y las contradicciones entre el presente estudio y otros llegando a las conclusiones pertinentes.

Se cumplió con lo establecido en la declaración de Helsinki y las recomendaciones expuestas en la “Guías internacionales para investigaciones biomédicas que incluyen sujetos humanos”. Se solicitó consentimiento informado a los sujetos. El proyecto de investigación se sometió a la consideración y aprobación por Consejo Científico de la institución. Se garantizó la confidencialidad de los datos, que solo serán utilizados con fines científicos.

Resultados

Incluimos en la investigación 88 pacientes con edad promedio de 46 años (mínima de 20 y máxima de 75); el 92% (n=81) fueron de sexo femenino y el 8% masculino (n=7). Los del grupo de edad de 41 a 50 años de edad fueron los más representados; en particular, prevalecieron las mujeres de 41 a 60 años con un 43.2% (n=38) y todos los hombres tenían 50 o menos años de edad (Tabla I).

El 80.7 % (n=71) de los pacientes no tenía ningún antecedente patológico conocido en el momento del estudio. En igual porcentaje se presentaron los pacientes con cáncer, quemaduras, zonas cruentas e hipertensión arterial con un 3.4% (n=3) cada uno (Tabla II).

La media del IMC fue de 26.6 ± 4.8 kg/m² (rango de 19 a 46 kg/m²). El 44.3% (n=39) de los pacientes presentaron un IMC normal, el 40.9 % (n=36) sobrepeso y el 14.8% (n=13) obesidad.

La región abdominal fue la zona donante más abordada con un 72.7% (n=64), seguida de la región lumbar con un 6.8% (n=6) y la submentoniana con un 4.5% (n=4) (Tabla III).

En la muestra de tejido adiposo emulsionada por método nanograsa y analizada por citometría de flujo se identificaron, con expresión de marcaje positivo, las células CD34+, CD45+/CD34+ y CD45-/CD34+. La mediana del porcentaje de CD34+ fue de 5.8 (mínimo de 0.2 y máximo de 62.3). El porcentaje mediano de CD45+/CD34+ y CD45-/CD34+ fue de 10.7 y 2.5 respectivamente (Tabla IV).

Tabla II. Distribución de los pacientes de nuestro grupo de estudio según antecedentes patológicos personales

Antecedentes patológicos personales	Nº	%
Ninguno	71	80.7
Hipertensión arterial	5	5.7
Quemadura	3	3.4
Cáncer	3	3.4
Zona cruenta	3	3.4
Alogenosis iatrogénica	2	2.3
Síndrome Mayer Rokitansky	1	1.1
Total	88	100.0

Tabla III. Distribución de los pacientes de nuestro grupo de estudio según zona donante

Zona donante	Nº	%
Abdominal	64	72.7
Lumbar	6	6.8
Submentoniana	4	4.5
Dorsal	3	3.4
Flancos	3	3.4
Brazos	3	3.4
Muslo	3	3.4
Trocantérica	1	1.1
Pliegue axilar anterior	1	1.1
Total	88	100.0

Tabla I. Distribución de los pacientes de nuestro grupo de estudio según edad y sexo

Edad (grupos)	Sexo		Total
	Femenino	Masculino	
20-30	17	0	17
	19.3%	0.0%	19.3%
31-40	12	3	15
	13.6%	3.4%	17.0%
41-50	19	4	23
	21.6%	4.5%	26.1%
51-60	19	0	19
	21.6%	0.0%	21.6%
61-70	8	0	8
	9.1%	0.0%	9.1%
Más de 70 años	6	0	6
	6.8%	0.0%	6.8%
Total	81	7	88
	92.0%	8.0%	100.0%
Estadísticos descriptivos de la edad (Media ± DE)	(45.9 ± 14.7)	(40.3 ± 6.4)	(45.5 ± 14.2)

La mediana del porcentaje de las células madre viables CD34+ fue superior en los pacientes con edad igual o superior a 60 años, y discretamente superior en el caso de CD45+/CD34+. No se encontraron diferencias significativas entre estas categorías (Tabla V).

El porcentaje mediano de células madre viables fue superior en los pacientes que no contaban con antecedentes de quemaduras, cáncer, alojenosis iatrogénica o zonas cruentas. No se encontraron diferencias relevantes en la expresión celular entre las categorías de la variable antecedentes patológicos personales (Tabla VI).

Al describir el porcentaje de células madre viable según el estado nutricional, en los pacientes que tenían un adecuado IMC (normopeso) se constató un valor medio

superior que en los pacientes con sobrepeso y obesidad. Sin embargo, esto no ocurrió así con el porcentaje medio de células madre viables CD45+/CD34+; este fue superior en pacientes con sobrepeso u obesidad respecto a los pacientes con peso considerado normal para la talla. No se encontraron diferencias significativas entre estas variables (Tabla VII).

En cuanto a la relación de la zona donante con la cuantificación de las ASC se evidenció un conteo máximo de CD34+ en la región abdominal con un valor de 62.51%, seguida de la región lumbar con un 54.70%, dorsal con 49.68% y submentoniana con un 11.47%; el mínimo conteo se presentó en la región trocantérica donde el mayor porcentaje de ASC fue 0.78% (Tabla VIII).

Tabla IV. Resumen de estadísticos descriptivos de las células madre viables en el tejido estudiado

Células madre viables	Mediana	Rango intercuartílico	Mínimo	Máximo
CD34+ (%)	5.8	27.7	0.2	62.3
CD45+/CD34+ (%)	10.7	11.4	0.3	48.4
CD45-/CD34+ (%)	2.5	7.0	0.0	45.0

Tabla V. Distribución de células madre viables en el tejido estudiado según la edad de los pacientes

Variables	Mediana	Rango intercuartílico	p*
CD34+ (%)	< 60 años	5.5	0,497
	≥ 60 años	8.7	
CD45+/CD34+ (%)	< 60 años	10.7	0,685
	≥ 60 años	11.0	
CD45-/CD34+ (%)	< 60 años	2.6	0,465
	≥ 60 años	2.3	

DE: desviación estándar. *Prueba U de Mann-Whitney, valor de p

Tabla VI. Distribución de células madre viables en el tejido estudiado según antecedentes patológicos personales

Antecedentes patológicos personales	Mediana	Rango intercuartílico	p*
CD34+ (%)	No	7.7	0.516
	Sí	2.8	
CD45+/CD34+ (%)	No	11.1	0.336
	Sí	7.1	
CD45-/CD34+ (%)	No	3.0	0.228
	Sí	1.4	

DE: desviación estándar. * Prueba U de Mann-Whitney, valor de p

Tabla VII. Distribución de células madre viables en el tejido estudiado según el estado nutricional de los pacientes

Variables	Mediana	Rango intercuartílico	p*
CD34+ (%)	Normopeso	9.3	0.740
	Sobrepeso/obesidad	5.4	
CD45+/CD34+ (%)	Normopeso	10.3	0.518
	Sobrepeso/obesidad	13.1	
CD45-/CD34+ (%)	Normopeso	2.8	0.936
	Sobrepeso/obesidad	2.1	

DE: desviación estándar. * Prueba U de Mann-Whitney, valor de p

Tabla VIII. Distribución de células madre viables en el tejido estudiado según zona donante

Zona donante	Máx. de CD34+ %
Abdominal	62.51
Lumbar	54.70
Dorsal	49.68
Submentoniana	11.47
Brazos	8.53
Muslo	8.12
Pliegue axilar anterior	1.80
Flancos	1.60
Región trocantérica	0.78

Discusión

La comparación que se hace de los resultados obtenidos en el presente estudio con el resto de las investigaciones a nivel internacional tiene una diferencia importante, y es que el método para desagregar las células madre para su análisis y caracterización es diferente. La mayoría de los estudios se basan en el procesamiento enzimático, mientras que en este estudio el procesamiento fue mecánico, llevando a análisis por citometría de flujo el tejido adiposo emulsionado obtenido por nanograsa. Esta diferencia motivó el estudio aun siendo conscientes de que pueda influir en el análisis comparativo de los resultados, lo que no deja de ser importante porque hasta donde hemos podido conocer, no hay estudios que analicen la composición en el tejido adiposo emulsionado cuyas muestras son sometidas a citometría.

Son diversos los métodos para determinar la presencia de ASC. Los análisis asociados con un único punto de tiempo específico o ensayo de instantánea se utilizan para evaluar cuantitativamente las ASC. Estos ensayos confirman el estado de las células en un momento determinado y su funcionalidad.

Para distinguir las ASC de las CMA de médula se propone utilizar otros dos marcadores, CD36 y CD106, porque se ha publicado que las ASC, a diferencia de las CMA, no expresan CD106 pero son positivas para CD36; sin embargo, se ha demostrado que en el tejido adiposo se pueden aislar células madre de extirpe hematopoyética que no proceden de la médula ósea y que incluso superan 10 veces el porcentaje de células madre obtenidas en sangre periférica en procedimientos de aféresis tras estimular la médula ósea. Esto pudiera estar relacionado con el origen del tejido adiposo, ya que el aislamiento de las mismas se ha producido después de eliminar, por diferentes métodos, todos los restos hemáticos del tejido adiposo liposucionado.⁽⁶⁾

Bourin y col.⁽⁴⁾ refieren que la citometría de flujo es un ensayo ampliamente utilizado para evaluar el inmunofenotipo de células madre estromales mesenquimales. Según la Federación Internacional de Terapéutica Adiposa (IFATS - *International Federation for Adipose Therapeuticss*) y la Sociedad Internacional de Terapia Celular y Génica (ISCT - *International Society for Cell & Gene Therapy*), las ASC en cultivo mantienen marcadores similares a otras CMA, ya que son positivas para CD90, CD73, CD105 y CD44 y negativas para CD45 y CD31. Informan que, en la SFV, las células se identifican fenotípicamente mediante los marcadores CD45-CD235a-CD31-CD34+. Refieren que para el componente estromal de la SFV, existe una combinación de marcadores negativos y positivos donde CD45 es el marcador clásico para identificar células de origen hematopoyético excepto los glóbulos rojos y debe excluirse, y CD31 es un marcador clásico de células endoteliales y sus progenitores aunque también se detecta en plaquetas y leucocitos. La expresión de CD34 es compartida por células madre/progenitoras hematopoyéticas y células endoteliales; por otra parte, según los datos publicados, también es un marcador potencial que debería usarse para identificar la población que contiene células estromales. Informan en su estudio de que según la literatura actual se recomienda el uso de anticuerpos CD34 de clase III para la caracterización de células de la SFV. Concluyen que el porcentaje de células CD34⁺ depende del método de recolección del tejido adiposo, del grado de hemorragia vascular y de las técnicas posteriores de digestión y aislamiento.⁽⁴⁾

En la presente investigación solo fue posible realizar la determinación de las células madre CD34 y CD45 debido a que solo se contó con marcadores para células madre hematopoyéticas, fluorocromos que se acoplan a monoclonales antiCD34 y CD45. Las muestras analizadas fueron obtenidas por método mecánico intraoperatorio, teniendo en cuenta las ventajas que este ofrece sobre el método enzimático en cuanto a la posibilidad de contaminación, infección y aberraciones cromosómicas tras su aplicación clínica. Estas muestras además de ser enviadas para su análisis, fueron utilizadas en tratamientos regenerativos de manera autóloga. Queremos hacer notar que las muestras que se enviaron para análisis son una parte de lo utilizado en el tratamiento de nuestros pacientes, fue un procedimiento intraoperatorio y por eso lo que se analiza es la nanograsa, no se utilizó método enzimático con collagenasa, ya que se quería investigar y caracterizar las células en su propio nicho.

Son múltiples los factores que influyen en el porcentaje de células madre, lo que da una caracterización personalizada de la expresión fenotípica celular del teji-

do adiposo. El envejecimiento es un proceso complejo caracterizado por una variedad de trastornos asociados con un deterioro generalizado y con la incapacidad de mantener la homeostasis de los tejidos. Las células madre persisten en numerosos tejidos reemplazando a las células maduras perdidas durante la actividad física o por una lesión; sin embargo, la función de las células madre puede disminuir con la edad, por lo que los tejidos envejecidos demuestran una menor capacidad de reparación y una mayor preponderancia de trastornos degenerativos. Choudhery y col.⁽⁷⁾ realizan un estudio donde caracterizan varias alteraciones relacionadas con la edad en las ASC, clasificando la muestra en grupos de pacientes jóvenes, de mediana edad y de avanzada edad; informan que existe una disminución significativa en el número de las ASC concomitante con la edad y paralela a un mayor tiempo de duplicación de la población y senescencia celular. Investigan el potencial de diferenciación *in vitro* de las ASC en pacientes menores de 30 años, de 35 a 50 años y mayores de 60 años, y refieren que independientemente de la edad del donante, las células madre fueron fuertemente positivas para los marcadores CD34, CD90, CD105 y carecían de marcadores para CD45 y CD14; tras esto, realizan la evaluación de la senescencia de las ASC mediante la medición de los niveles de ARNm de los genes p16 y p21 y reportan que la expresión de ambos genes es mayor en los pacientes de edad avanzada que en los grupos de pacientes jóvenes, concluyendo que la edad es un factor influyente en la cuantificación y caracterización de las mismas. Nuestra investigación concuerda con estos resultados, ya que evidenció una mayor cuantificación de células madre en pacientes de edad avanzada.

Por su parte, Horinouchi y col.⁽⁸⁾ estudian la influencia de la edad del donante en la capacidad de diferenciación y división de las células madre obteniendo las ASC de tejido liposucionado en pacientes con edades que oscilaban entre los 20 y 70 años de edad, valores con los que concuerda nuestra investigación. Realizan una distribución de las células en 2 grupos según el rango de edad: antiguas las de pacientes mayores de 55 años y jóvenes las de los menores de 35 años; en ambos grupos realizan la caracterización inmunofenotípica mediante citometría de flujo con marcadores positivos para CD34 y negativos para CD45. Sus resultados reportan que respecto a la morfología celular los 2 grupos mostraron características similares, concluyendo que no había diferencias significativas en cuanto a la morfología, ni inmunofenotípicas entre los donantes de diferentes edades, resultados con los que no concuerda nuestra investigación, en la cual, sí se presentaron diferencias en la cuantificación de las células madre en dependencia de la edad de los

pacientes, encontrando menor número en los pacientes jóvenes. Por otro lado, hacen alusión a la gran variación en el porcentaje de células CD34+ tanto para el grupo joven como para el antiguo, con oscilaciones entre 1.88% y 14.9%, situación que también se evidenció en nuestro estudio, donde los pacientes de edad avanzada presentaron mayor porcentaje de células CD34+.

Los datos acerca del papel de la obesidad en la función de las ASC también son contradictorios. Algunos estudios sugieren que el índice de masa corporal (IMC) no influye en la concentración y el rendimiento de las células, mientras que otros informan de una correlación positiva o negativa. Geissler y col.⁽⁹⁾ realizan un estudio prospectivo en 42 pacientes divididos en 2 grupos, el primero con IMC menor de 25 kg/m² y el otro mayor de 25 kg/m², en quienes se realizó liposucción manual del área abdominal con posterior centrifugación y cultivo para aislamiento de las ASC. Reportan que no existe una correlación estadísticamente significativa entre el rendimiento de las células y su capacidad de proliferación en relación con la edad y el IMC. Después de agrupar su muestra en pacientes con peso normal y sobrepeso en quienes obtuvieron la grasa liposucionando el abdomen, la parte interna de los muslos y los flancos, informan que no hay diferencias significativas en el rendimiento y cuantificación de las ASC entre pacientes normopeso y obesos. Nuestro estudio no concuerda con lo reportado por estos autores, ya que en nuestros resultados sí se evidenció diferencia en el porcentaje de las células madre en relación con el IMC, evidenciando una mayor cuantificación en los pacientes normopeso, pero sí concuerda con el área donante del tejido adiposo, donde el abdomen tuvo prevalencia como zona de mayor elección para tomar la muestra de tejido adiposo, lo que puede estar relacionado con que en esta región anatómica las ASC son más resistentes a la apoptosis y hay un 5% más que en el resto de las zonas donantes.

Por otro lado, Strong y col.⁽¹⁰⁾ refieren que la cuantificación y eficacia terapéutica de las ASC aisladas en pacientes delgados fue superior que la que presentaron las aisladas en los pacientes obesos, lo que indica que esta enfermedad reduce o elimina los efectos antiinflamatorios de las ASC de modo que no pueden ser una fuente de células adecuada, resultados con los que concuerda nuestro estudio ya que en nuestras muestras se encontró un mayor porcentaje de células madre en pacientes con un adecuado IMC, lo que puede relacionarse con que el tejido adiposo sano se considera cada vez más no solo como un depósito de energía, sino como un órgano endocrino con un papel importante en la regulación metabólica normal; a su vez, se ha demostrado que los adipocitos en los pacientes obesos son disfuncionales debido

a la inducción de un microambiente celular hipóxico e inflamatorio. Además, hacen referencia a las alteraciones que sufren los elementos celulares que componen el tejido adiposo en los pacientes obesos, específicamente, en relación con las ASC; la relación se determina porque en los pacientes sanos las ASC se diferencian a adipocitos y estos a su vez se desdiferencian hacia células madre, y esto mantiene el porcentaje en el organismo. Por otro lado, en el paciente obeso la diferenciación es unidireccional sin ocurrir el proceso de desdiferenciación, y todo va encaminado a acumular más energía en forma de adipocitos que se almacenan de forma patológica.

Desde el punto de vista de la variabilidad del donante existen estudios que han demostrado que la edad, el sexo, la obesidad y el síndrome metabólico, modifican las propiedades de las ASC; por otro lado, hay muy pocas investigaciones que analicen el potencial terapéutico de estas células en pacientes con antecedentes de cáncer, en los que el potencial regenerativo de las ASC podría verse afectado por la enfermedad o el tratamiento que reciben. Villagrasa y col.⁽¹¹⁾ reportan los resultados de su estudio realizado en pacientes con antecedentes de cáncer urológico en comparación con pacientes sanos caracterizando las células mediante el empleo de citometría de flujo, con resultados que evidencian que los pacientes con antecedentes oncológicos produjeron una cinética de crecimiento similar, presentaron marcadores de superficie hematopoyéticos equivalentes y mostraron un potencial de diferenciación similar al de las ASC aisladas en pacientes sanos con edad avanzada, lo que puede estar relacionado con el antecedente demostrado de menor porcentaje de ASC en pacientes de mayor edad, en concordancia con los resultados de nuestra investigación en la que en los pacientes senescentes se evidenció menor cuantificación. Por su parte, Posada y col.⁽⁵⁾ hacen referencia a un estudio en el que se analizó la capacidad proliferativa de las ASC en pacientes con antecedente de cáncer gástrico o esofágico y pacientes sanos, evidenciando que las células obtenidas en los individuos enfermos no tienen el mismo potencial de diferenciación y exhiben una secreción distinta de citoquinas proinflamatorias, resultados con los que concuerda el presente estudio en donde la mayor cuantificación de las células madre se evidenció en los pacientes sin ningún antecedente patológico.

De igual manera que el tejido adiposo se distribuye en todo el organismo con características anatomofisiológicas diferentes según la región, el comportamiento de las ASC contenidas en él también varía, lo que motivó estudiar las diferencias de las mismas según la zona donante. Guneta y col.⁽¹²⁾ realizan un estudio comparativo entre las células obtenidas del abdomen y las provenientes de la mama y refieren que las células provenientes

de las 2 zonas donantes poseen una expresión de marcadores similar y un potencial de diferenciación multi-linaje similar; no obstante, observan que las derivadas del abdomen parecen contribuir al recambio de tejido adiposo, mientras que las del tejido mamario pueden ser responsables de complicaciones como quistes oleosos, calcificaciones y necrosis grasa.

Nepalí y col.⁽¹³⁾ realizan un análisis comparativo de las ASC de tejido orbitario y abdominal, aisladas mediante cirugía de blefaroplastia y liposucción. Las ASC fueron estudiadas mediante citometría de flujo para analizar sus antígenos de superficie, obteniendo como resultado que las procedentes de la grasa periorbitaria mostraron expresiones más altas que las abdominales. Aunque como mencionan los autores, las ASC periorbitarias tienen más capacidad hacia la adipogénesis y osteogénesis, no constituyen la zona donante de elección porque es una zona de difícil acceso, permitirían su utilización en una sola oportunidad y hay mayor dificultad para desagregar las ASCs, porque se obtiene la bolsa adiposa con estroma, siendo necesaria la aplicación de colagenasa para el aislamiento de las mismas, además de ser un tejido necesario en la zona orbitaria que solo se resea en caso de herniación del mismo.

Tsekouras y col.⁽¹⁴⁾ hacen referencia a los resultados de su investigación en la que evidencian que el tejido adiposo del abdomen, la cintura, el muslo y la rodilla, no revela diferencias significativas con respecto al perfil de viabilidad de las células. También demuestran que el depósito abdominal superficial es menos susceptible a la apoptosis en comparación con las ASC de las otras regiones. Informan que, al momento de comparar el rendimiento celular, este fue mayor en la región externa del muslo donde también existía una concentración superior. En nuestra investigación no se realizó análisis de la viabilidad ni del rendimiento celular; sí de la concentración, que a diferencia de lo antes expuesto fue muy superior en la región abdominal respecto al muslo en su cara interna y en la región trocantérica. Los resultados de la presente investigación concuerdan con los autores que consideran que la zona abdominal, además de proporcionar un mayor número de células madre, está demostrado que estas tienen un mejor potencial regenerativo de diferenciación con una cinética de crecimiento estable, por lo que se consideran la fuente ideal para enriquecer el tejido adiposo autólogo.⁽¹⁴⁻¹⁶⁾

Comprender los fenotipos que definen dichas células es útil para tomar decisiones adecuadas en diferentes indicaciones clínicas regenerativas, por lo que recomendamos continuar la investigación para, con una mayor muestra, identificar otros factores que modifiquen la expresión de las ASC.

Conclusiones

En nuestro estudio, realizado sobre muestras de tejido adiposo procesadas por método mecánico de nanograsa y analizadas mediante citometría de flujo, la edad, el índice de masa corporal, los antecedentes patológicos y el sitio de recolección del tejido graso, fueron determinantes para la caracterización de células madre hematopoyéticas derivadas del tejido adiposo. Se observó mayor número de células madre en pacientes de mayor edad, por encima de los 50 años, sin patologías asociadas, y cuya zona donante fue la región abdominal.

En nuestra opinión, la presente investigación resulta de gran utilidad ya que se necesita demostrar con objetividad la presencia de células madre en el tejido adiposo emulsionado, así como precisar algunas variables que pudieran influir en una mayor o menor concentración de las mismas en aras de alcanzar los mejores resultados terapéuticos con su aplicación.

Dirección del autor

Dra. C. Alicia María Tamayo Carbón
Correo electrónico: aliciatamayo67@gmail.com

Bibliografía

1. Lasso JM, Cortina E, Goñi E, Arenas L, Nava P, Fernández ME, et al. Estado actual de las terapias con células madre derivadas de tejido adiposo en el ámbito de la Cirugía Plástica. *Cir. plást. iberolatinoam.* 2010;36(3): 215-221.
2. Serna Cuéllar E, Santamaría Solís L. Protocolo de extracción y procesamiento de células madre adultas del tejido adiposo abdominal: coordenadas del cirujano plástico en la investigación traslacional. *Cir. plást. iberolatinoam.* 2013;39 (Suppl 1): s44-s50.
3. Planas J, Muñoz J, González D. Descripción de un nuevo sistema cerrado de procesamiento de grasa para la obtención de nanofat: análisis de resultados clínicos y citométricos. *Cir. plást. iberolatinoam.* 2017;43(1): 23-32.
4. Bourin P, Bunnell BA, Casteilla L, Dominici M, Katz AJ, March KL, et al. Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the International Society for Cellular Therapy (ISCT). *Cytotherapy.* 2013;15(6):641-648.
5. Posada González M, Villagrasa A, García Arranz M, Vorwald P, Olivera R, Olmedillas López S, et al. Comparative Analysis Between Mesenchymal Stem Cells From Subcutaneous Adipose Tissue and Omentum in Three Types of Patients: Cancer, Morbid Obese and Healthy Control. *Surg Innov.* 2022;29(1):9-21.
6. Newman CB, Chait A. Update on Lipids and Lipoproteins. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2022;51(3):15-16.
7. Choudhery MS, Badowski M, Muise A, Pierce J, Harris DT. Donor regenerative lymphocytes impacts adipose tissue-derived mesenchymal stem cell expansion and differentiation. *J Transl Med.* 2014;12:8.
8. Horinouchi CD, Barisón MJ, Robert AW, Kuligovski C, Aguiar AM, Dallagiovanna B. Influence of donor age on the differentiation and division capacity of human adipose-derived stem cells. *World J Stem Cells.* 2020;12(12):1640-1651.
9. Geissler PJ, Davis K, Roostaeian J, Unger J, Huang J, Rohrich RJ. Improving fat transfer viability: the role of aging, body mass index, and harvest site. *Plast Reconstr Surg.* 2014;134(2):227-232.
10. Strong AL, Bowles AC, Wise RM, Morand JP, Dutreil MF, Gimble JM, et al. Human Adipose Stromal/Stem Cells from Obese Donors Show Reduced Efficacy in Halting Disease Progression in the Experimental Autoimmune Encephalomyelitis Model of Multiple Sclerosis. *Stem Cells.* 2016;34(3):614-626.
11. Villagrasa A, Posada González M, García Arranz M, Zapata AG, Vorwald P, Olmedillas López S, et al. Implication of stem cells from adipose tissue in wound healing in obese and cancer patients. *Cir Cir.* 2022;90(4):487-496.
12. Guneta V, Tan NS, Sugii S, Lim TC, Wong TC, Choong C. Comparative Study of Adipose-Derived Stem Cells From Abdomen and Breast. *Ann Plast Surg.* 2016;76(5):569-575.
13. Nepali S, Park M, Lew H, Kim O. Comparative Analysis of Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells from Orbital and Abdominal Fat. *Stem Cells Int.* 2018;2018:3932615.
14. Tsekouras A, Mantas D, Tsimimigras DI, Moris D, Kontos M, Zografos GC. Comparison of the Viability and Yield of Adipose-Derived Stem Cells (ASCs) from Different Donor Areas. *In Vivo.* 2017;31(6):1229-1234.
15. Travnickova M, Pajorova J, Zarubova J, Krocilova N, Molitor M, Bacakova L. The Influence of Negative Pressure and of the Harvesting Site on the Characteristics of Human Adipose Tissue-Derived Stromal Cells from Lipoaspirates. *Stem Cells Int.* 2020;2020:1016231.
16. Jovic D, Preradovic L, Kremenovic M, Jovic F, Antonic M, Aleksic Z, Ljubojevic V. Effect of Donor Site Selection for Fat Grafting on the Yield and Viability of the Stromal Vascular Fraction. *Aesthet Surg J.* 2023;43(9):NP704-712.

