

## Identificación de células madre hematopoyéticas por citometría de flujo en tejido adiposo obtenido por Nanofat

Identification by flow cytometry of hematopoietic stem cells in adipose tissue obtained by Nanofat

Alicia María Tamayo Carbón <sup>1\*</sup> <https://orcid.org/0000-0002-5006-266X>

Diana Katherine Cuastumal Figueroa<sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0001-5277-281X>

Arturo Chang Monteagudo<sup>2</sup> <https://orcid.org/0000-0002-0843-372X>

<sup>1</sup>Hospital Clínico Quirúrgico “Hermanos Ameijeiras”, La Habana, Cuba

<sup>2</sup>Instituto de Hematología e Inmunología, La Habana, Cuba

Correspondencia: [aliciatamayo67@gmail.com](mailto:aliciatamayo67@gmail.com)

### RESUMEN

**Introducción:** El adipocito caracteriza el tejido adiposo, pero lo componen también las células madre, preadipocitos, macrófagos, neutrófilos, linfocitos, y células endoteliales. Uno de los componentes que ha adquirido mayor relevancia es la fracción vascular estromal, que incluye células vasculares, sanguíneas y precursoras de adipocitos.

**Objetivos:** Demostrar la presencia de células madre hematopoyéticas en el tejido adiposo obtenido por liposucción y la relación de la expresión celular con las características de los pacientes.

**Método:** Estudio descriptivo y transversal, desarrollado entre julio/2019 y julio/2020, en pacientes con criterios para liposucción atendidos en el servicio de

cirugía plástica del Hospital Ameijeiras. A todos se les realizó medición de células madre mediante métodos inmunológicos, utilizando un citómetro de flujo MACSQuant 10, con tinción con anticuerpos monoclonales PE-CD34 y FITC-CD45 y yoduro de propidio como sonda fluorescente específica de ADN para precisar la viabilidad celular en tejido adiposo obtenido por *nanofat*.

**Resultados:** Predominó el sexo femenino (94,1 %); el grupo de 31 a 40 años (64,7 %) e índice de masa corporal entre 25,1 y 30 kg/m<sup>2</sup> (47 %). Los pacientes con quemaduras y cáncer de mama presentaron menores resultados de recolección de células madre. Los mayores porcentajes de células madre se encontraron en los pacientes con índice de masa corporal igual o menor a 25 kg/m<sup>2</sup> (38.6 % y 63 %) y edad entre 20 y 30 años (más del 50 %).

**Conclusiones:** Se demostró la presencia de células madre hematopoyéticas del tejido adiposo cuya concentración varía en dependencia de las características del donante.

**Palabras clave:** citometría de flujo; tejido adiposo; células madre; anticuerpos monoclonales

## ABSTRACT

**Introduction:** The adipocyte characterizes the adipose tissue, but it is also composed of stem cells, preadipocytes, macrophages, neutrophils, lymphocytes, and endothelial cells. One of the components that has become more relevant is the stromal vascular fraction, which includes vascular cells, blood cells and adipocyte precursors.

**Objective:** To demonstrate the presence of hematopoietic stem cells in adipose tissue obtained by liposuction and the relationship of cellular expression with the characteristics of the patients

**Method:** Descriptive and cross-sectional study, developed between July/2019 and

July/2020, in patients with criteria for liposuction treated in the plastic surgery service of Ameijeiras Hospital. Stem cell measurement was performed on all of them by immunological methods, using a MACSQuant 10 flow cytometer, with staining with monoclonal antibodies PE-CD34 and FITC-CD45 and propidium iodide as a specific fluorescent DNA probe to specify cell viability in tissue. adipose obtained by nanofat.

**Results:** Female sex predominated (94.1%); the group from 31 to 40 years old (64.7%) and body mass index between 25.1 and 30 kg/m<sup>2</sup> (47%). Patients with burns and breast cancer had lower stem cell harvesting results. The highest percentages of stem cells were found in patients with a body mass index equal to or less than 25 kg/m<sup>2</sup> (38.6% and 63%) and age between 20 and 30 years (more than 50%).

**Conclusions:** The presence of hematopoietic stem cells from adipose tissue was demonstrated, whose concentration varies depending on the characteristics of the donor.

**Keywords:** flow cytometry; adipose tissue; stem cells; monoclonal antibodies

Recibido: 22/09/23

Aceptado: 13/10/23

## Introducción

El descubrimiento de las células madre hematopoyéticas del tejido adiposo es relativamente reciente. Se cree que se originan a partir de una población de células estromales y se encuentran en la actualidad en investigación por su potencialidad para una variedad de tratamientos.<sup>(1)</sup>

Una de las posibles aplicaciones es en la regeneración de tejidos dañados. Por ejemplo, se ha demostrado que pueden diferenciarse en células del músculo esquelético, lo que sugiere que podrían ser útiles en la reparación de lesiones musculares. Además, se ha investigado su uso en la regeneración del tejido nervioso y en la reparación de lesiones de la médula espinal. Estas células pueden actuar como reguladoras de la respuesta inmunitaria, lo que podría ser beneficioso en el tratamiento de las enfermedades autoinmunes.<sup>(2)</sup>

El tejido adiposo deriva de la capa mesodérmica y se forma en el segundo trimestre de gestación. Su diferenciación celular procede de la secuencia adipoblasto – preadipocito – adipocito inmaduro - adipocito maduro, mediada por células troncales multipotentes con propiedades similares a las obtenidas desde la médula ósea. Probablemente el progenitor de los adipocitos proviene de la médula ósea a través de la circulación.<sup>(3)</sup>

La célula que caracteriza al tejido adiposo es el adipocito, pero no es el único tipo celular presente en este tejido. Lo componen también células madre, macrófagos, neutrófilos, linfocitos y células endoteliales, entre otros. La presencia de células madre en este tejido fue descrita por primera vez en 2001 y en 2007, se demostró su propiedad regenerativa <sup>(4)</sup>

El aislamiento de las células madres derivadas del tejido adiposo puede hacerse por un método enzimático o mecánico. Cuando el proceso se realiza mecánicamente, los adipocitos se fracturan mediante emulsificación mecánica y filtración, dejando intacta la VSF viable. El producto final que se obtiene de este proceso se conoce como Nanofat. Se basa en la interrupción mecánica del tejido adiposo a través de conectores *luer lock* de pequeño diámetro, seguido de filtración. <sup>(5)</sup>

Aunque se requiere un mayor número de investigaciones para comprender del todo el potencial de estas células en la terapia celular, constituyen una prometedora

área de investigación. Por tal motivo, en el presente estudio se aplicó la citometría de flujo al tejido adiposo obtenido por liposucción y procesado por Nanofat, con el objetivo de demostrar la presencia de células madre hematopoyéticas y la relación de la expresión celular con las características de los pacientes.

## Métodos

Se realizó un estudio en pacientes con criterios de liposucción atendidos en el servicio de cirugía plástica y caumatología del Hospital Clínico Quirúrgico “Hermanos Ameijeiras” entre julio de 2019 y julio de 2020, y que otorgaron su consentimiento para formar parte de la investigación.

Se incluyeron 16 mujeres y un hombre, con un promedio de edad de 36 años. Se calculó el índice de masa corporal (IMC) y se clasificaron los sujetos según la metodología de la Organización Mundial de la Salud. <sup>(6)</sup> Se incluyeron seis pacientes con antecedentes patológicos personales como causa directa o indirecta de la indicación del procedimiento, el resto se consideró sano. (Tabla 1)

**Tabla 1** - Antecedentes patológicos personales de los sujetos incluidos

Antecedentes patológicos personales	n (%)
Alogenosis iatrogénica	2 (11.8)
Cáncer de mama	1 (5.9)
Quemaduras	2 (11.8)
Riodermatitis	1 (5.9)
Sano	11 (64.7)
<b>Total</b>	<b>17 (100)</b>

Se excluyeron pacientes embarazadas o lactando, con trastornos psiquiátricos,

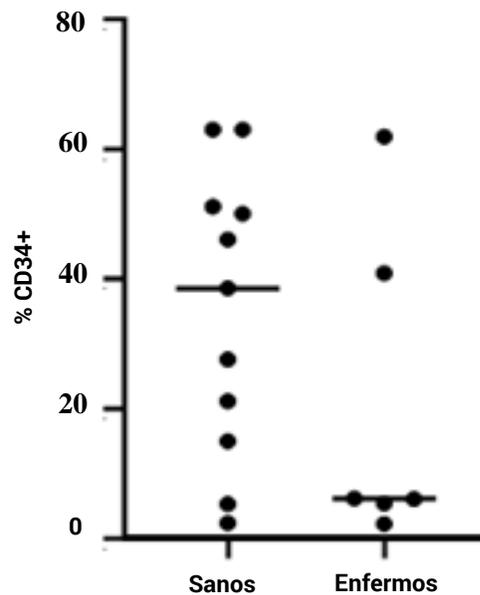
enfermedades agudas o crónicas descompensadas, propensos a formar queloides, con infección cutánea o sistémica, fumadores y alcohólicos, y aquellos bajo tratamiento con anticoagulantes, antifibrinolíticos, antiinflamatorios no esteroideos, corticoesteroides o inmunosupresores.

Se realizó aspiración de tejido adiposo por liposucción en la región infraumbilical, lumbar o trocantérica con cánula de 3 mm y jeringuilla de 20 mL decantación de la grasa por 10 min, emulsión con *transfer* de 0.7 mm, 1 mm, 1.5 mm, 2.5 mm, de mayor a menor diámetro, por rejilla Nanofat y filtración.

Para la identificación de las células madre se utilizó un citómetro de flujo MACSQuant 10 (Milteny, Alemania). Las muestras se tiñeron simultáneamente con anticuerpos monoclonales anti-CD34-PE y anti-CD45-FITC (Milteny, Alemania). Se calculó el porcentaje de células CD34+CD45+ sobre el total de células CD45+. Se utilizó yoduro de propidio excluir las células no viables.

## Resultados

La mediana del porcentaje de células CD34+CD45+ calculado sobre el total de células CD45+ en los sujetos sanos fue del 38,6 % y en los pacientes con antecedentes patológico personales, del 6,2 % (fig. 1).



**Fig. 1.** Porcentaje de las células CD34+CD45+ según antecedentes patológicos personales.

Los pacientes con un peso normal según el IMC, presentaron la mayor mediana del porcentaje de células CD34+, que fue de 55,5 %. Los clasificados como sobrepeso y obesos tuvieron menores porcentajes, 18,1% y 23,2, respectivamente (fig. 2).

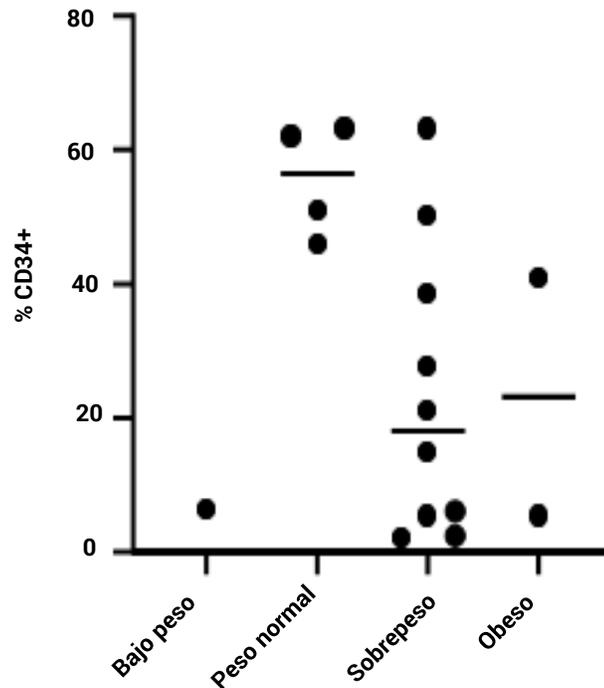


Fig. 2. Porcentaje de las células CD34+CD45+ según índice de masa corporal.

Se encontró que con el aumento de la edad existe una tendencia a la disminución del porcentaje de las células CD34+ (Fig. 3).

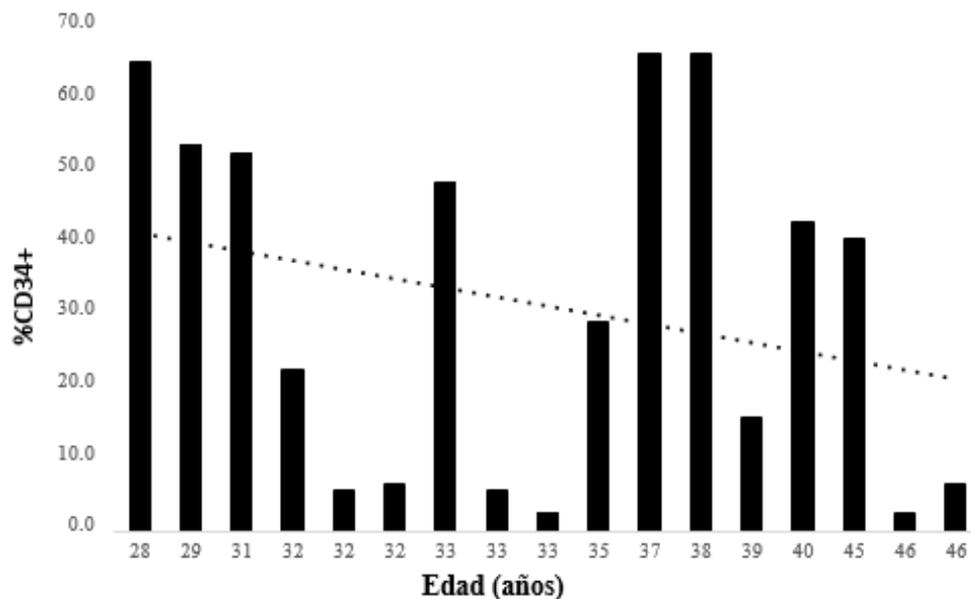


Fig. 3. Porcentaje de las células CD34+CD45+ según edades.

## Discusión

Prant y colaboradores plantearon que el recobrado de células progenitoras derivadas del tejido adiposo dependen del método para la enumeración y del protocolo de aislamiento, <sup>(7)</sup> por lo que, para eliminar el sesgo, en la presente investigación todas las muestras fueron obtenidas, tratadas y evaluadas con igual metodología.

Tanto a los productos de la liposucción como de la abdominoplastia se les pueden aplicar métodos de disgregación mecánica y de digestión enzimática. <sup>(8)</sup> El tratamiento enzimático permite aislar mejor y cultivar las células madre, sin embargo, la disrupción mecánica por *nanofat* que se utilizó en la presente investigación, 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. <sup>(8,9)</sup>

El hallazgo de la presente investigación con respecto al porcentaje de células CD34+CD45 en los sujetos sanos, que fue 32,4 puntos porcentuales mayor que en aquellos que presentaron alguna enfermedad al momento de la lipotransferencia (fig. 1), pudo deberse a que el tejido adiposo es un reservorio de células pluripotenciales que se movilizarían hacia otras localizaciones durante los procesos patológicos.

Existen pocas investigaciones que asocien las características del donante con el número de células madre hematopoyéticas que se recuperan en el lipoaspirado.<sup>(10, 11,12,13)</sup> Kiliñç y colaboradores encontraron que el género, la edad, el IMC y el antecedente de cáncer podrían afectar el rendimiento, la composición, la pureza y la potencia los elementos celulares específicos en la fracción vascular estromal aislada. <sup>(13)</sup>

Los pacientes clasificados como sobrepeso y obesos tuvieron menores porcentajes de células CD34+ CD45+, en comparación con los de peso normal, lo que pudo deberse a los cambios tisulares condicionados por crecimiento del tejido adiposo de forma no fisiológica. (fig. 2) Una de las importancias de este hallazgo se evidencian en el citado trabajo de Kiliñç y colaboradores, quienes demostraron que la proporción entre las células madre hematopoyéticas y células estromales/madre del tejido adiposo pueden modificar el resultado final de las terapias celulares. <sup>(13)</sup>

El proceso de inmunosenescencia podría guardar relación con el presente resultado que muestra una tendencia a que con el aumento de la edad de los donantes se recupere un menor porcentaje de células CD34+ CD45+ (fig. 3). Choudhery y colaboradores encontraron que la edad del donante impacta de forma negativa en la posterior expansión y diferenciación de las células

mesenquimales derivadas del tejido adiposo, lo que podría impactar de forma negativa en el éxito de las terapias celulares. <sup>(11)</sup>

Las células madre hematopoyéticas en el tejido adiposo obtenido por Nanofat que se identificaron por citometría de flujo presentaron una concentración relativa diferente según las condiciones biológicas del donante.

## Referencias bibliográficas

1. Meruane-Naranjo M. Fat grafting: fundamentals and clinical application. Rev Méd Clín Condes. 2016;27(1):93-106. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rmclc.2016.01.012>
2. Yoshimura K. Cell-Assisted Lipotransfer and Therapeutic Use of Adipose Stem Cells Thereafter. Aesthetic Plast Surg. 2020;44(4):1266-7. doi: <https://doi.org/10.1007/s00266-020-01781-4>.
3. Hausman GJ, Hausman DB. Search for the preadipocyte progenitor cell. J Clin Invest. 2006;116(12):3103-6.
4. Si Z, Wang X, Sun C, Kang Y, Xu J, Wang X, et al. Adipose-derived stem cells: Sources, potency, and implications for regenerative therapies. Biomed Pharmacother. 2019;114:108765. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.108765>.
5. 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 Plast Iberolatinoam. 2017[citado: 20/09/23];43(1):23-32. Disponible en: [http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0376-78922017000100004&lng=es](http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0376-78922017000100004&lng=es).
6. Weir CB, Jan A. BMI Classification Percentile and Cut Off Points, 2023 Jun 26.

In: StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan-. PMID: 31082114.

7. Prantl L, Eigenberger A, Brix E, Kempa S, Baringer M, Felthaus O. Adipose Tissue-Derived Stem Cell Yield Depends on Isolation Protocol and Cell Counting Method. *Cells*. 2021;10(5):1113. doi: <https://doi.org/10.3390/cells10051113>

8. Pineda Molina C, Londoño Peláez C. Obtención de células madre del tejido adiposo y su potencial de diferenciación osteogénico. *Rev Ing Biomed*. 2009 [cited 20/09/23]; 3(5): 58-65. Disponible en: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1909-97622009000100010&lng=en](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1909-97622009000100010&lng=en).

9. Tamayo Carbón AM, Bencosme Escarramán YY, Medina Robainas RE. Supervivencia del injerto graso: factores pronósticos. *Rev Cient Cienc Med*. 2020 [citado 20/09/23]; 23(2):231-9. Disponible en: [http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1817-74332020000200014&lng=es](http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1817-74332020000200014&lng=es).

10. Dos-Anjos Vilaboa S, Navarro-Palou M, Llull R. Age influence on stromal vascular fraction cell yield obtained from human lipoaspirates. *Cytotherapy*. 2014;16(8):1092-7. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2014.02.007>

11. Choudhery MS, Badowski M, Muise A, Pierce J, Harris DT. Donor age negatively impacts adipose tissue-derived mesenchymal stem cell expansion and differentiation. *J Transl Med*. 2014;12:8. doi: <https://doi.org/10.1186/1479-5876-12-8>

12. van Harmelen V, Skurk T, Rohrig K, Lee YM, Halbleib M, Aprath-Husmann I, et al. Effect of BMI and age on adipose tissue cellularity and differentiation capacity in women. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2003;27(8):889-95. doi: <https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0802314>

13. Kilinc MO, Santidrian A, Minev I, Toth R, Draganov D, Nguyen D, et al. The ratio

of ADSCs to HSC- progenitors in adipose tissue derived SVF may provide the key to predict the outcome of stem-cell therapy. Clin Transl Med. 2018;7(1):5. doi: <https://doi.org/10.1186/s40169-018-0183-8>.

### **Conflicto de intereses**

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses

### **Contribución de autoría**

*Conceptualización:* Alicia María Tamayo Carbón, Arturo Chang Monteagudo

*Curación de datos:* Alicia María Tamayo Carbón, Diana Katherine Cuastumal Figueroa, Arturo Chang Monteagudo

*Análisis formal:* Alicia María Tamayo Carbón, Diana Katherine Cuastumal Figueroa, Arturo Chang Monteagudo

*Investigación:* Alicia María Tamayo Carbón, Diana Katherine Cuastumal Figueroa, Arturo Chang Monteagudo

*Metodología:* Alicia María Tamayo Carbón, Arturo Chang Monteagudo

*Redacción borrador- original:* Alicia María Tamayo Carbón, Diana Katherine Cuastumal Figueroa

*Redacción revisión-edición:* Alicia María Tamayo Carbón, Arturo Chang Monteagudo