

El tejido adiposo como fuente alternativa en la medicina regenerativa

Adipose tissue as an alternative source for regenerative medicine

**Lic. Bertha Beatriz Socarrás-Ferrer^I, Lic. Lázaro Orlando del Valle-Pérez^I,
Lic. Karelys de la Cuétara-Bernal^{II}, DrC. José Armando Galván-Cabrera^I,
DrC. Antonio Bencomo-Hernández^I, DrC Consuelo Macías-Abraham^I**

^I Instituto de Hematología e Inmunología, La Habana, Cuba.

^{II} Centro Internacional de Restauración Neurológica, La Habana, Cuba.

RESUMEN

El tejido adiposo constituye una fuente alternativa en la terapia celular debido a diferentes factores como su fácil extracción, su alto contenido de células madre mesenquimales y la capacidad de su expansión *ex vivo* que puede ser equivalente o hasta superior a las células obtenidas de la médula ósea en términos de su habilidad de diferenciación, potencial de angiogénesis y sus efectos inmunomoduladores en la inflamación. Estas células presentan el siguiente perfil de expresión: marcaje positivo para CD29, CD44, CD54, CD90, CD105 y HLA clase I y negativas para CD45, CD116, CD14, CD31 y HLA-II. En la actualidad existen evidencias que las células madre derivadas de tejido adiposo tienen el potencial de diferenciarse, además, a células de origen no mesodérmico como: neuronas, células pancreáticas, endocrinas, hepatocitos, cardiomiocitos y células epiteliales, entre otras. Debido a todos estos factores y a la ausencia de problemas éticos e inmunológicos, sugieren una nueva posibilidad en el tratamiento de muchas enfermedades comunes a la práctica médica cotidiana.

Palabras clave: células madre mesenquimales, células madre derivadas del tejido adiposo, terapia celular

ABSTRACT

Adipose tissue is an alternative source in cell therapy due to various factors such as its easy extraction, its high content of mesenchymal stem cells and their capacity of *ex vivo* expansion which can be equivalent or even superior to cells obtained from bone marrow in terms of its ability of differentiation potential of angiogenesis and its immunomodulatory effects in inflammation. These cells have the following expression profile: positive staining for CD29, CD44, CD54, CD90, CD105 and HLA-I; and negative for CD45, CD116, CD14, CD31 and HLA-II. At present, there is evidence that the stem cells derived from adipose tissue has have the potential to differentiate in addition to cells of mesodermal origin as neurons, pancreatic cells, endocrine, hepatocytes, cardiomyocytes and epithelial cells, among others. Because of All these factors and the absence of ethical and immunological problems suggest a new possibility in the treatment of many diseases common to everyday medical practice.

Keywords: mesenchymal stem cells, stem cells derived from adipose tissue, cell therapy

INTRODUCCIÓN

El tejido adiposo se deriva del mesodermo embrionario; es muy heterogéneo, tanto al nivel de composición celular como en su disposición anatómica.¹ Está compuesto por adipocitos maduros inmersos en una matriz de colágeno donde también residen células madre mesenquimales, preadipocitos, terminales nerviosos y tejido vascular, que en su conjunto se denomina fracción del estroma vascular(FEV).^{1,2} Su diferenciación celular procede de la secuencia: adipoblasto-preadipocito-adipocito inmaduro-adipocito maduro. Tanto los adipocitos maduros como la FEV son esenciales para el mantenimiento de la función del tejido adiposo y en consecuencia, participan en el control del metabolismo glucídico y lipídico y en la producción y liberación de adipoquinas.¹⁻³ Estas adipoquinas participan en una gran variedad de funciones fisiológicas como son: regulación de la homeostasis energética y vascular, regulación del metabolismo lipídico, control del apetito, sensibilidad a insulina, angiogénesis e inmunidad.³

La primera vez que se consideró la existencia de células madre mesenquimales en el tejido adiposo fue en el año 2001 cuando se describió una población celular multipotente con morfología fibroblastoide, obtenidas de la FEV del tejido adiposo y con capacidad de diferenciarse a osteocitos, condrocitos y adipocitos.^{1,4}

Durante los últimos años, este grupo de células recibió diferentes nombres en la literatura científica, pero en el año 2004, en el Congreso Internacional de IFATS

(del inglés: *Internacional Federation for Adipose Therapeutics and Science*), se decidió unificar las distintas nomenclaturas y se definieron como células madre derivadas del tejido adiposo (del inglés: *ASC: adipose derived stem cells*) y se tomaron los siguientes criterios de identificación:

- 1- Células con morfología fusiforme que se aíslan mediante digestión enzimática y adhesión al plástico.
- 2- Con capacidad de autorrenovación por largos periodos de tiempo.
- 3- Multipotenciales (se diferencian a adipocitos, condrocitos y osteocitos)
- 4- Que tienen el siguiente perfil de expresión: marcaje positivo para CD29, CD44, CD90 y CD105 y un marcaje negativo para CD34, CD45 y CD133. ^{1, 5, 6}

En la actualidad, el tejido adiposo es una de las principales fuentes alternativas de células madre de fácil obtención y alto potencial de diferenciación hacia linajes celulares especializados. Esto se debe a diferentes factores como su facilidad de extracción, su alto contenido de células madre mesenquimales y la capacidad de expansión que puede ser similar o hasta superior a las células obtenidas de la médula ósea. ¹⁻³

CAPACIDAD REPARADORA DE LAS CÉLULAS MADRE DERIVADAS DE TEJIDO ADIPOSO (ASC)

Después de comprobada la similitud entre los ASC y las células madre procedentes de la médula ósea (tabla 1) y considerando su facilidad de obtención, se han intensificado las investigaciones interesadas en el potencial de las ASC. ⁷

Tabla 1. Comparación de las células madre mesenquimales obtenidas de médula ósea (BM-MSc) y las derivadas de tejido adiposo (ASC)

Parámetros	BM-MSc	ASC
Cantidad tejido donante	Menos abundante	Más abundante
Accesibilidad	Poco accesible (dentro del hueso)	Muy accesible (subcutáneo)
Técnica de extracción	Precisa anestesia general Más morbilidad	Anestesia local Escasa morbilidad
Rendimiento	Menor efectividad	Mayor efectividad
Características de las células	Potencialidad y capacidad reparadora	Potencialidad y capacidad reparadora

Un gran número de estudios han demostrado la capacidad de las ASC de origen murino y humano de reparar pequeños daños en tejidos *in vivo*. ^{1, 7, 8}

investigaciones sirven para probar nuevos biomateriales que se utilizarán en la clínica como soporte para la reparación de huesos.^{7,9}

Otros trabajos relevantes sobre las posibilidades de las ASC están basados en su capacidad de diferenciación a tejido músculo-esquelético, lo que permitirá la reparación de daños musculares tras una isquemia.^{1,7,10}

La inyección de ASC en animales con daño cerebral demostró que las células, incluso después de varias semanas, se incorporan a la región dañada y muestran marcadores neuronales y morfología de neurona, astrocito y oligodendrocito.⁹⁻¹¹

También se investiga la capacidad inmunomoduladora de las ASC para utilizarlas en la enfermedad de injerto contra huésped o en enfermedades inflamatorias y se ha comprobado en modelos animales de inflamación (artritis reumatoide, colitis intestinal) que las ASC son capaces de disminuir el proceso inflamatorio y además controlar la respuesta de las células T.^{10,12}

FORMAS DE OBTENCIÓN Y CULTIVO

Las ASC se han aislado de humanos y de otras especies mediante liposucción o biopsias de tejido graso con el empleo de un protocolo sencillo que implica tratamiento enzimático y la propiedad de estas células de adherirse a los plásticos en el cultivo celular.^{1,13}

Las muestras de tejido adiposo son obtenidas mediante cánulas de lipoaspiración conectadas a presión negativa entre 400-600 mm de Hg. Los fragmentos son disgregados mecánicamente (con el objetivo de reducirlos). Posteriormente se lava con solución buffer fosfato (PBS), volumen a volumen, se agita para eliminar las células sanguíneas, la solución salina y el anestésico local. Después se realiza la digestión enzimática de la matriz extracelular con el uso de colagenasa tipo II preparada al 0,075 % durante 30 min a 37°C, que se inactiva con suero fetal bovino (10 - 20 %). Después de la centrifugación se obtiene un precipitado de alta densidad. El botón celular obtenido o FEV se resuspende en el medio adecuado y se coloca en placas de cultivo.^{11,13}

La cantidad de FEV obtenida depende: de la especie animal e incluso dentro de una misma especie, del donante y de la región donde se realiza la liposucción. La mayoría de los investigadores describen que se obtienen dos millones de células mononucleares por mililitro de lipoaspirado, del cual se recolecta, en una semana, un aproximado de 100 mil células adherentes por mililitro. Se afirma que la frecuencia de ASC en la región estromal de la grasa subcutánea es de 5 000 unidades formadoras de colonias (CFU) por gramo de tejido adiposo, lo que es significativamente más alta que la cantidad de células que se pueden obtener de la médula ósea (entre 100-1 000).^{6,14}

El medio de cultivo habitual contiene: medio de crecimiento DMEM (*Medio Eagle* modificado de Dulbecco, 10 - 20 % de suero fetal bovino, 1 % de antibióticos (penicilina-estreptomicina-anfotericina B) y glutamina 100 UI/mL. Las células se mantienen a 37°C y 5 % de CO₂. Se lavan a las 24 horas con PBS para eliminar las células no adheridas al plástico. Los cultivos permanecen en la incubadora con cambio del medio de cultivo dos veces a la semana. Al obtener confluencia (\geq al 30 %, del quinto al séptimo día) se realiza una tripsinización al 0,05 %, con el objetivo de despegar las células del plástico y llegar al segundo pasaje.^{14,15}

Algunos autores describen más de 200 ciclos de replicación *ex vivo* de las ASC sin alteraciones fenotípicas ni genéticas y se acepta por la comunidad científica que poseen una capacidad ilimitada de crecimiento.^{16,17}

Las ASC pueden ser crioconservadas durante largos periodos (hasta años) en nitrógeno líquido y mantienen su viabilidad, así como sus propiedades biológicas.¹⁷

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 (VCAM-1) es el principal marcador que diferencia a las células obtenidas de la médula ósea y las derivadas del tejido adiposo.⁴ Al igual que las células madre mesenquimales procedentes de médula ósea, las ASC son consideradas inmunoprivilegiadas no solo por carecer de antígenos HLA clase II, sino también por su habilidad de suprimir la reacción linfocítica mixta, por lo que se pueden injertar de forma alogénica.^{12, 20}

Inicialmente, cuando se aíslan las células, los marcadores de membrana son muy heterogéneos, con el paso del tiempo (sobre las placas de cultivo), la población celular se vuelve más homogénea, lo que se comprueba mediante micromatrices y estudios proteómicos.^{3, 20}

En los últimos años se ha observado la expresión de marcadores de células madre embrionarias en la superficie de las ASC: Oct-4, Rex-1 y Sox-2 durante al menos 10 ciclos de replicación. También se describen vías de señalización que regulan, tanto la proliferación como la diferenciación celular (vía molecular Wnt; esfingosilfosforilcolina y FGF-2).^{15, 20}.

CAPACIDAD DE DIFERENCIACIÓN DE LAS CÉLULAS MADRE DERIVADAS DE TEJIDO ADIPOSO

Las ASC tienen la capacidad de diferenciarse en células de origen mesodérmico como: fibroblastos, miocitos, osteocitos, adipocitos y condrocitos, proceso denominado diferenciación linaje-específica. (tabla 2). En la actualidad existen

evidencias de que las ASC también poseen potencial para su diferenciación hacia tejidos distintos al de su origen como: neuronas, células pancreáticas endocrinas, hepatocitos, cardiomiocitos y células epiteliales. A este proceso se le denominó "diferenciación cruzada".^{1, 21, 24}

Tabla 2. Linajes mesodérmicos y tinciones histológicas

Linaje	Determinante específico	Tinción inmunohistoquímica
Adipogénico	Acumulación lipídica	Rojo oleoso
Osteogénico	Producción de matriz calcificada Actividad Fosfatasa Alcalina	Von Kossa Fosfatasa Alcalina
Condrogénico	Matriz proteoglicanos sulfatados Síntesis colágeno tipo II	Azul Alcian AcMo colágeno II
Miogénico	Multinucleación, expresión de MyODI	AcMo para miosina y MyODI

Es importante mencionar que los beneficios obtenidos con este tipo de terapia celular no solo se deben a su capacidad de diferenciación en múltiples linajes, sino que además tienen la característica de liberar citocinas y factores de crecimiento (al ser implantadas en el sitio dañado o lesionado) que estimulan al resto de las células locales de manera paracrina como: el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), el factor de crecimiento hepatocítico (HGF) y el factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-I), y de esta forma promueven la neoangiogénesis y el reclutamiento de células madre mesenquimales.^{1, 9, 25} De igual manera, las ASC proveen antioxidantes y reducción de radicales libres en el sitio isquémico, con lo que disminuyen la cantidad de sustancias tóxicas y permiten la recuperación de las células locales sobrevivientes.^{1, 13}

ALGUNAS APLICACIONES CLÍNICAS DE LAS CÉLULAS MADRE DERIVADAS DE TEJIDO ADIPOSO

Distintos investigadores reportan la utilización de estas células con resultados satisfactorios para el cierre de fístulas enterocutáneas en pacientes con enfermedad de Crohn, ya sea de forma directa o aplicadas después de cultivadas.²⁶ Además, se han aplicado para el cierre de fístulas traqueomediastínicas y úlceras cutáneas de difícil cicatrización, secundarias a radioterapia.^{27, 28}

La inyección de grasa autóloga lipoaspirada más ASC para el aumento de tejido blando, es un procedimiento denominado por Matsumoto y col *-cell-assisted lipotransfer* (CAL)-, que implica 35 % más de supervivencia del injerto graso.²⁹

Posteriormente, Yoshimura y col. describieron y aplicaron este proceder para mamoplastia de aumento sin prótesis.³⁰

Por otra parte, existen otros ensayos clínicos con buenos resultados que utilizan como fuente terapéutica las ASC como en las reparaciones óseas (hueso, menisco) y cartilagosas (tendones, ligamentos, cartílagos); además, incluyen enfermedades vasculares, en la cirugía estética, en tratamientos de la diabetes y de la patología fistulosa, y se han realizado estudios para evaluar la repuesta de estas células en el infarto agudo del miocardio e insuficiencia cardíaca. Los mejores informes se reportan en la cicatrización de heridas. Estas aplicaciones clínicas están basadas en la plasticidad de las células mesenquimales y su potencial poder antiinflamatorio e inmunomodulador.^{1, 8-11}

Podemos concluir que el tejido adiposo cuenta con la mayor cantidad de células del cuerpo y presenta una concentración 500 veces superior a la de la médula ósea, lo que unido a la fácil accesibilidad al tejido, su alta capacidad regeneradora y la ausencia de problemas éticos e inmunológicos, sugieren una nueva alternativa terapéutica en el tratamiento de muchas enfermedades comunes a la práctica médica cotidiana.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Minter D, Marra KG, Rubin JP. Adipose-derived mesenchymal stem cells: biology and potential applications. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 2013;129:59-71. doi: 10.1007/10_2012_146. PMID: 22825719
- 2- [Baer PC](#), [Geiger H](#). Adipose-derived mesenchymal stromal/stem cells: tissue localization, characterization, and heterogeneity. *Stem Cells Int*. 2012; 2012:812693. PMID: 22577397
- 3- Madriz de Haan P. Células madre: Fuentes no embriónicas accesibles. *Med. Leg. Costa Rica* [revista en la Internet]. 2010 Sep [citado 2012 Oct 02] ; 27(2): 35-46. Disponible en: http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1409-00152010000200005&lng=es .
- 4- De Ugarte [DA](#), [Alfonso Z](#), [Zuk PA](#), [Elbarbary A](#), [Zhu M](#), [Ashjian P](#), et al. Differential expression of stem cell mobilization-associated molecules on multi-lineage cells from adipose tissue and bone marrow. *Immunol Lett*. 2003 Oct 31;89(2-3):267-70. PMID:14556988
- 5- Meruane M, Rojas M. Células troncales derivadas del tejido adiposo. *Int. J. Morphol.* [revista en la Internet]. 2010 Sep [citado 2012 Oct 02] ; 28(3): 879-889. Disponible en:

- http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-95022010000300035&lng=es. doi: 10.4067/S0717-95022010000300035.
- 6- Dominici M, [Le Blanc K](#), [Mueller I](#), [Slaper-Cortenbach I](#), [Marini F](#), [Krause D](#), et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. [Cytotherapy](#). 2006; 8(4):315-7. PMID: 16923606
 - 7- Rada T, [Santos TC](#), [Marques AP](#), [Correlo VM](#), [Frias AM](#), [Castro AG](#), [Gomes ME](#), et al. Osteogenic differentiation of two distinct subpopulations of human adipose-derived stem cells: an in vitro and in vivo study. [J Tissue Eng Regen Med](#). 2012 Jan;6(1):1-11. doi: 10.1002/term.388. PMID:21294275.
 - 8- Rada T, Reis RL, Gomes ME. Adipose tissue-derived stem cells and their application in bone and cartilage tissue engineering. [Tissue Eng Part B Rev](#). 2009 Jun;15(2):113-25. PMID: 19196117.
 - 9- Trounson A, Thakar RG, Lomax G, Gibbons D. Clinical trials for stem cell therapies. [BMC Med](#). 2011 May 10;9:52. PMID: 21569277.
 - 10-Trounson A. New perspectives in human stem cell therapeutic research. [BMC Med](#). 2009 Jun 11;7 :29. PMID: 19519878.
 - 11-Mizuno H. Adipose-derived stem and stromal cells for cell-based therapy: current status of preclinical studies and clinical trials. [Curr Opin Mol Ther](#). 2010 Aug;12(4):442-9. PubMed; PMID: 20677095.
 - 12-[Kebriaei P](#), [Robinson S](#). Treatment of graft-versus-host-disease with mesenchymal stromal cells. [Cytotherapy](#). 2011 Mar;13(3):262-8. PMID: 21231805.
 - 13- [Bunnell BA](#), [Flaat M](#), [Gagliardi C](#), [Patel B](#), [Ripoll C](#). Adipose-derived stem cells: isolation, expansion and differentiation. [Methods](#). 2008 Jun;45(2):115-20. PMID: 18593609.
 - 14- Estrada R, Venegas P. Comparación de diferentes protocolos para el cultivo de células madre mesenquimales de origen adiposo. [Rev. Costarric. Cienc. Méd \[revista en la Internet\]](#). 2007 Jun [citado 2012 Oct 02] ; 28(1-2): 21-28. Disponible en: http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0253-29482007000100003&lng=es.
 - 15- Gruber HE, [Somayaji S](#), [Riley F](#), [Hoelscher GL](#), [Norton HJ](#), [Ingram J](#), et al. Human adipose-derived mesenchymal stem cells: serial passaging, doubling time and cell senescence. [Biotech Histochem](#). 2012 May;87(4):303-11. PMID:22250760
 - 16-Van Harmelen [V](#), [Röhrig K](#), [Hauner H](#). Comparison of proliferation and differentiation capacity of human adipocyte precursor cells from the omental

- and subcutaneous adipose tissue depot of obese subjects. [Metabolism](#). 2004 May; 53(5):632-7. PMID: 15131769.
- 17-Oedayrajsingh-Varma MJ, [van Ham SM](#), [Knippenberg M](#), [Helder MN](#), [Klein-Nulend J](#), [Schouten TE](#), et al. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cell yield and growth characteristics are affected by the tissue-harvesting procedure. [Cytotherapy](#). 2006;8(2):166-77. PMID: 16698690.
- 18-[Yoshimura K](#), [Shigeura T](#), [Matsumoto D](#), [Sato T](#), [Takaki Y](#), [Aiba-Kojima E](#), et al. Characterization of freshly isolated and cultured cells derived from the fatty and fluid portions of liposuction aspirates. [J Cell Physiol](#). 2006 Jul;208(1):64-76. PMID:16557516.
- 19-[Katz AJ](#), [Tholpady A](#), [Tholpady SS](#), [Shang H](#), [Ogle RC](#). Cell surface and transcriptional characterization of human adipose-derived adherent stromal (hADAS) cells. [Stem Cells](#) 2005 Mar;23(3):412-23. PMID: 15749936.
- 20-Mitchell JB, [McIntosh K](#), [Zvonic S](#), [Garrett S](#), [Floyd ZE](#), [Kloster A](#), et al. Immunophenotype of human adipose-derived cells: temporal changes in stromal-associated and stem cell-associated markers. [Stem Cells](#). 2006 Feb;24(2):376-85. PMID: 16322640
- 21-[Matsumoto S](#). Islet cell transplantation for Type 1 diabetes. [J Diabetes](#). 2010 Mar;2(1):16-22. doi: 10.1111/j.1753-0407.2009.00048.x PMID: 20923470.
- 22-[Tedesco FS](#), [Dellavalle A](#), [Diaz-Manera J](#), [Messina G](#), [Cossu G](#). Repairing skeletal muscle: regenerative potential of skeletal muscle stem cells. Repairing skeletal muscle: regenerative potential of skeletal muscle stem cells. [J Clin Invest](#). 2010 Jan;120(1):11-9. doi: 10.1172/JCI40373. PMID: 20051632.
- 23-Dhawan A, [Strom SC](#), Sokal E, Fox IJ. Human hepatocyte transplantation. [Methods Mol Biol](#). 2010; 640:525-34. doi: 10.1007/978-1-60761-688-7_29. PMID: 20645072.
- 24-Kung JW, Forbes SJ. Stem cells and liver repair. [Curr Opin Biotechnol](#). 2009 Oct; 20(5):568-74. PMID: 19837579
- 25-[Mizuno H](#). Adipose-derived stem cells for tissue repair and regeneration: ten years of research and a literature review. [J Nippon Med Sch](#). 2009 Apr;76(2):56-66. PMID:19443990
- 26-Garcia-Olmo [D](#), [Herrerros D](#), [Pascual I](#), [Pascual JA](#), [Del-Valle E](#), [Zorrilla J](#), et al. Expanded adipose-derived stem cells for the treatment of complex perianal fistula: a phase II clinical trial. [Dis Colon Rectum](#). 2009 Jan;52(1):79-86. PMID: 19273960
- 27-[Schäffler A](#), [Büchler C](#). Concise review: adipose tissue-derived stromal cells--basic and clinical implications for novel cell-based therapies. [Stem Cells](#). 2007 Apr;25(4):818-27. PMID: 17420225
-

- 28-Rigotti G, [Marchi A](#), [Galiè M](#), [Baroni G](#), [Benati D](#), [Krampera M](#), et al. Clinical treatment of radiotherapy tissue damage by lipoaspirate transplant: a healing process mediated by adipose-derived adult stem cells. [Plast Reconstr Surg.](#) 2007 Apr 15;119(5):1409-22; discussion 1423-4. PMID: 17415234
- 29-Matsumoto [D](#), [Sato K](#), [Gonda K](#), [Takaki Y](#), [Shigeura T](#), [Sato T](#), et al. Cell-assisted lipotransfer: supportive use of human adipose-derived cells for soft tissue augmentation with lipoinjection. [Tissue Eng.](#) 2006 Dec;12(12):3375-82. PMID:17518674
- 30-Yoshimura K, Sato K, Aoi N, Kurita M, Hirohi T, Harii K. Cell-assisted lipotransfer for cosmetic breast augmentation: supportive use of adipose-derived stem/stromal cells. *Aesthetic Plast Surg.* 2008 Jan;32(1):48-55; discussion 56-7. PMID: 17763894.

Recibido: febrero 21, 2013

Aceptado: junio 3, 2013

Lic. Bertha B Socarrás Ferrer. INSTITUTO DE HEMATOLOGÍA E INMUNOLOGÍA.
Apartado 8070, La Habana, CP 10800, CUBA.

Tel (537) 643 8695, 8268

Fax (537) 644 2334

Email: rchematologia@infomed.sld.cu