



PRECURSORES HEMATOPOYÉTICOS EN EL TEJIDO ADIPOSO HUMANO.

V. Mirabet¹, P. Solves¹, M.D. Miñana², F. Carbonell-Uberos¹, L. Larrea¹, M.A. Soler¹, C. Riol¹, I. Plasencia¹, A. Bernárdez¹, I. Terrón¹, L. Más¹, R.J. Roig¹.

¹Centro de Transfusión de la Comunidad Valenciana.

¹Fundación Hospital General Universitario (Valencia).

La grasa se ha revelado como una fuente alternativa a la médula ósea para la obtención de células pluripotentes. La mayor parte de los estudios realizados se refieren a su capacidad de diferenciación osteogénica, condrogénica, adipogénica y miogénica. Sin embargo, las opciones terapéuticas que requieren potencial hematopoyético, se basan en el uso de células de la médula ósea (MO, obtenidas *in situ* o bien de sangre periférica (SP), previa movilización) o de la sangre de cordón umbilical (SCU). El presente trabajo analiza la presencia de células precursoras hematopoyéticas en el tejido adiposo humano.

Para obtener la fracción correspondiente al estroma vascular, el tejido adiposo se digirió con colagenasa I (1mg/ml en M199) y, luego, se centrifugó (500xg 10min). El sedimento fue resuspendido en M199 (para los ensayos de centrifugación con hidroxietil almidón (HES) o Lymphoprep™) o solución de NH₄Cl 160mM, con el fin de seleccionar la población celular nucleada. Seguidamente, las suspensión celular resultante de cada uno de los procedimientos utilizados (HES, Lymphoprep™ y hemolisis) se cribó utilizando un tamiz de 70µ y se centrifugó (500xg 10min) para obtener un sedimento que se resuspendió en medio de cultivo (DMEM con suero humano 15% y gentamicina). El rendimiento del procedimiento fue, aproximadamente, 10⁶ células nucleadas por cada gramo de tejido adiposo. La suspensión celular se sembró en frascos de cultivo (37°C, humedad 95% y CO₂ 5%). Su perfil fenotípico se muestra en la tabla 1. Después de

TABLA 1 (% poblacional)	CD45 ^{neg}	CD45 ^{pos}
CD90 ^{pos}	64,8±18,1%	35,1±18,2%
CD105 ^{pos}	85,2±10,7%	38,1±16,1%
CD105 ^{pos}	20,8±6,9%	39,4±18,7%
CD13 ^{pos}	78,9±12,3%	31,1±8,1%
CD31 ^{pos}	22,8±9,1%	30,1±8,6%
CD34 ^{pos}	84,3±12,6%	38,5±14,9%

48h en estas condiciones, se retiró el sobrenadante, que contenía el 9,8±4,3% de las células sembradas, y se añadió medio de cultivo fresco. Por su parte, el sobrenadante se centrifugó (500xg 10min) y el sedimento así obtenido se resuspendió en Iscove y se sembró en Methocult®. A los 14 días, se procedió a la lectura de los cultivos, diferenciando por tipos de colonias BFU-E, CFU-GM y CFU-GEMM. El fenotipo de las células presentes en el sobrenadante (tabla 2) evidenció un enriquecimiento de la población CD45^{pos}. No obstante, la presencia de células adherentes en el sobrenadante fue una constante, incluso cuando se demoró el primer cambio de medio hasta el día 5 de cultivo. Incrementar el tiempo de adhesión sólo facilitó la presencia en la superficie de cultivo de monocitos. El trasvase del primer sobrenadante sucesivamente hasta 3 veces (tras períodos de 48h), siempre dio lugar a crecimiento de células adherentes de tipo fibroblástico. Este hecho fue independiente de la densidad del inóculo.

TABLA 2 (% poblacional)	CD45 ^{neg}	CD45 ^{pos}
CD90 ^{pos}	53,5±16,3%	46,5±16,3%
CD90 ^{pos}	53,4±20,9%	23,1±9,5%
CD105 ^{pos}	39,3±20,5%	19,3±7,9%
CD13 ^{pos}	42,6±10,2%	14,7±11,1%
CD31 ^{pos}	41,8±6,9%	36,1±12,3%
CD34 ^{pos}	76,4±10,9%	20,3±11,5%

En 2 de las 15 muestras de tejido adiposo procesadas no fue posible obtener colonias en los cultivos clonogénicos hematopoyéticos. No se identificó ninguna causa que pudiera justificar dicha ausencia (ocasionalmente, esto sucede con muestras de MO, SP o SCU). Por cada 10⁵ células sembradas se obtuvieron 2,5±1,7 CFU-GM, 1,5±1,4 BFU-E y 0,3±0,5 CFU-GEMM. Hay que tener presente que una proporción significativa de las células sembradas corresponde, como se ha citado antes, a células fibroblásticas no adheridas en el cultivo primario. En principio, los diferentes sistemas utilizados para eliminar los hematíes residuales no mostraron diferencias significativas, aunque en este estudio sólo se incluyeron 5 de las muestras procesadas.

En cualquier caso, la grasa es una fuente abundante y con menor morbilidad que, por ejemplo, la MO. Además de las ya conocidas células fibroblásticas pluripotentes, ahora también los pericitos, las células de estirpe endotelial y los progenitores hematopoyéticos se añaden al arsenal terapéutico. El reto siguiente es el establecimiento de metodologías eficientes para la selección celular.