

Fracción vascular estromal de tejido adiposo: cómo obtener células madre y su rendimiento de acuerdo a la topografía de las áreas donantes: estudio preliminar

Stromal vascular fraction from fat tissue: obtaining stem cells and their yield according to the topography of the donor areas: previous note



Almeida, K. A.

Almeida, K. A.* , Campa, A.* , Alonso-Vale, M. I. C. **, Lima, F. B.** , Daud, E. D.*** , Stocchero, I. N.****

Resumen

La obtención de tejido adiposo supone un nuevo y prometedor mercado de trabajo para los cirujanos plásticos, ya que los bancos de tejidos escogerán de forma acertada la grasa como el medio más fácil para obtener fuentes de células madre de alto rendimiento, en la medida en que este tejido es capaz de producir al menos cinco veces más unidades formadoras de colonias (UFCs) que la médula ósea. El objetivo del presente trabajo es mostrar lo que se puede esperar del tejido adiposo como origen de células adultas de fracción vascular estromal (FVE), y señalar las mejores áreas del cuerpo humano para ser elegidas como donantes de tejido adiposo, extraído mediante liposucción.

Describimos la rutina seguida para la obtención de células de FVE mediante la digestión de las muestras de tejido adiposo humano con colagenasa. En el momento de su recolección, esas células presentaban una viabilidad de 92+/- 1% basada en exclusión por Azul de Trypan. Las células de FVE recontadas después de permanecer 48 horas en medio de cultivo de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), dentro de una cámara de Neubauer, tras lo cual el rendimiento medio de las células de FVE fue de 7,2 +/- 1,3 x 10³ células por mililitro de tejido lipoaspirado.

En conclusión, pensamos que supone un desafío en la actualidad el mejorar las estrategias para la obtención de células de FVE. Este trabajo, por ahora preliminar, muestra que las células de FVE pueden ser fácilmente obtenidas por medio de liposucción. La comparación entre las diferentes áreas donantes, mostró un rendimiento 22% más alto para las células de FVE cuando el tejido adiposo había sido obtenido del tronco, en comparación a cuando lo había sido de los miembros.

Palabras clave Células madre, Grasa, Tejido adiposo, Lipoaspiración, Lipectomía, Fracción vascular estromal

Código numérico 19

Abstract

The harvest of adipose tissue will be a promising labor marketing for plastic surgeons, since tissue banks will certainly choose fat as the easiest way to obtain a high-yield source of stem cells, as this type of tissue can produce at least five times more colony-forming units (CFUs) than bone marrow extracts.

The aim of this study is to show what can be expected from fat tissues as an origin of adult stromal vascular fraction (SVF) cells, and to evaluate the best areas to be elected as donor sites within the human body, all obtained by liposuction.

The routine to obtain SVF cells by collagenase digestion of human adipose tissue samples was described. At the time of harvest, these cells displayed a viability of 92+/- 1% based on Trypan Blue exclusion, SVF cells were counted after 48 hours culture in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) in a Neubauer counting chamber.

The average yield of SVF cells was 7,2 +/- 1,3 x 10³ cells per milliliter of liposuctioned tissue.

As a conclusion, best strategies to obtain SVF cells are an important challenge nowadays. This study, although preliminary, showed that SVF may be easily obtained

From liposuction. Comparison among different donor sites showed a 22% higher yield of SVF cells when fat tissue had been obtained from the trunk regions, when confronted with limbs.

Key words Stem cells, Fat, Adipose tissue, Liposuction, Lipectomy, Stromal vascular fraction.

Numerical Code 19

* Departamento de Análisis Clínicos y Toxicológicos, Facultad de Farmacia, Universidad de São Paulo, Brasil

** Departamento de Fisiología y Biofísica, Instituto de Ciencias Biomédicas, Universidad de São Paulo, Brasil

*** Departamento de Cirugía Plástica, Facultad de Medicina, Universidad de ABC, São Paulo, Brasil

**** Jefe del Departamento de Cirugía Plástica, Hospital Santa Catarina, São Paulo, Brasil

Introducción

La Cirugía Plástica, en su busca por la reparación y la mejoría estética, ha indagado en diversas fuentes a lo largo de los tiempos, en busca de las mejores soluciones, algunas todavía en fases experimentales (1-3). Actualmente la investigación en torno a las denominadas células madre adultas, muestra un camino prometedor en el campo de la Medicina y de la Cirugía Reparadora. Las células de la fracción vascular estromal (FVE) humana ya fueron aisladas de la médula ósea, del periostio, del hueso trabecular, del tejido adiposo, de la sinovial, del músculo esquelético y de la dentición decidua (4-7). En la actualidad, existen diversos métodos para aislar FVE basados en sus características físicas y físico-químicas, como por ejemplo, su adherencia a plásticos o a otros componentes de la matriz extracelular. Debido a su facilidad de aislamiento y a su extenso potencial de diferenciación, se piensa que la FVE está compuesta por tipos de células madre con buenas perspectivas para ser introducidas en breve en la práctica clínica. La identificación de varias FVE que mantiene su capacidad para diferenciarse en múltiples tipos de células, ha representado una etapa crítica en la obtención de potenciales fuentes de células para la ingeniería tisular.

El tejido adiposo representa una fuente alternativa de células madre disponible de forma rutinaria en grandes cantidades (litros) a través de liposucción. Los depósitos subcutáneos de tejido adiposo son accesibles, abundantes y reponibles, por lo que suponen una reserva potencial de células madre adultas en cada individuo. Muchos grupos de investigación, trabajando de forma independiente, han demostrado que las células madre derivadas del tejido adiposo consiguen diferenciarse *in vitro* en múltiples linajes, entre los cuales encontramos adipocitos, condrocitos, hepatocitos y osteoblastos, además de células endoteliales, epiteliales, hematopoyéticas, neuronales y miogénicas (8-12). Se han empleado muchos términos para identificar las células de FVE, incluyendo los de células precursoras de adipocitos, preadipocitos, células tronco adultas derivadas del subcutáneo, células estromales derivadas del tejido adiposo, células estromales adherentes derivadas del tejido adiposo, células de liposucción procesado y células tronco derivadas del tejido adiposo. En este trabajo emplearemos el término células de FVE.

Aunque algunos grupos hayan centrado su atención exclusivamente en la subpoblación expandida adherente al plástico en varios estadios, otros han trabajado con la población de células de FVE mínimamente procesadas. Por tanto, la mayor parte del conocien-

to actual ha evolucionado desde estudios que investigaron las propiedades de su progenie *in vitro*. Es más, grupos de esas células pueden ser inducidos a expresar el perfil bioquímico de muchos tipos de células, bajo condiciones apropiadas de cultivo *in vitro*. Después de su expansión *in vitro*, está descrito que el número de FVE *in vivo* aumentó de 10^5 a 10^6 su densidad original en el tejido adiposo. Por otro lado, los resultados varían significativamente en muchas publicaciones, probablemente porque todavía no se ha establecido ningún protocolo estándar. En consecuencia, falta una estimación más precisa del número de FVE.

El objetivo del presente trabajo fue protocolizar un método para el aislamiento, mantenimiento y rendimiento de FVE humanas obtenidas a partir de tejido adiposo de distintas regiones del tejido subcutáneo, mediante lipoaspiración, dado que las células madre derivadas del tejido adiposo presentan ventajas potenciales para su aplicación en ingeniería tisular.

Material y método

Aislamos un total de 12 muestras de tejido adiposo humano (ginecomastia bilateral n=1, abdomen n=3, "cartucheras" n=3, flancos n=2, cara interna de los muslos n=1 y brazos n=2), obtenidas a partir de 21 áreas tratadas en 7 pacientes consecutivos (1 hombre y 6 mujeres) sometidos a cirugía electiva (Tabla I). La edad media (media +/- desviación estándar (DP)) fue de 45 +/- 13 años, con un rango de 36 a 68 años. El índice de masa corporal (IMC) fue de 24 +/-3, rango de 22 a 29. Ningún paciente presentaba infección, enfermedad o alteración endocrina. Este estudio fue aprobado y se guió por las orientaciones del Comité de Ética de la Facultad de Farmacia de la Universidad de São Paulo, Brasil. Todos los pacientes fueron informados de los objetivos y procedimientos de la investigación y firmaron su consentimiento por escrito.

Preparación de los tejidos y aislamiento de las células

Utilizamos cánulas con diámetro interno de 3 a 5 mm, conectadas a jeringa de aspiración de 60 ml. (Fig. 1), para los procedimientos de lipoaspiración. El aislamiento de los adipocitos se hizo de acuerdo con Rodbell (13). Las muestras de tejido adiposo (20 ml) fueron fragmentadas con tijera fina e introducidas en frascos (4 g/ frasco), cada uno de ellos con un contenido de 20 ml. de DMEM estéril, 5 mM de glucosa, 1% de albúmina sérica bovina (ASB) fracción V, antibióticos (100 μ M/ml de Penicilina en 100 μ g/ml de Estrptomomicina) y 1 mg/ml de Colagenasa tipo II, ph



Fig. 1. Grasa lipoaspirada. Cánula con diámetro interno de 5 mm conectada a jeringa de 60 ml empleada para la lipoaspiración.
Gordura lipoaspirada. Cânula com diâmetro interno de 5mm, conectada a seringa de 60ml, utilizada para os procedimentos de lipoaspiração.

7,4. La mezcla fue incubada en un agitador orbital a 150 rpm durante 30 minutos a 37° C. El material digerido fue filtrado a través de una malla plástica gruesa y, en seguida, de una malla plástica fina, siendo después transferido a un tubo plástico cónico de 50 ml. El filtrado resultante fue centrifugado a 300 G durante 5 minutos. Después de la centrifugación, había 3 capas reconocibles: una capa blanca fluctuante compuesta por los adipocitos, el medio de digestión y un sedimento que contenía las células FVE más los eritrocitos (Fig.2). El sedimento de FVE del fondo del tubo de centrifugado fue resuspendido en 6 ml de tampón; entre tanto, alícuotas de 3 ml de la última mezcla fueron colocadas en una placa de cultivo de 6 pozos. Las células fueron alimentadas con medio estromal compuesto de DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) y 1% de solución antibiótica (100 μ U/ml de Penicilina y 100 μ g/ml de Estrptomomicina) y mantenidas durante 48 horas en incubadora de CO₂. Después de este periodo, el medio de incubación fue eliminado y la placa lavada cuatro veces, cada una de



Fig. 2. Capa blanca flotante constituida por adipocitos, el medio de digestión y un sedimento que contiene las células de FVE más eritrocitos.
Uma camada branca flutuante constituída de adipócitos; o meio de digestão; e o pellet contendo as células da FVE mais eritrócitos.

ellas con 3 ml de solución salina estéril tamponada con fosfato, a fin de eliminar cualquier célula no adherente. Las células adherentes (Fig.3) fueron trypsinizadas, recolectadas, centrifugadas a 300 G y resuspendidas en 1 ml de DMEM con 10 % de SFB. Se contaron las células en una cámara de Neubauer. En el momento de la recolección, esas células presentaban una viabilidad de 92 +/- 1%, basada en exclusión con Azul de Trypan. Las células fueron vueltas a colocar en placas e incubadas por un periodo adicio-



Fig. 3. Células adherentes de FVE.
As células aderentes da FVE.

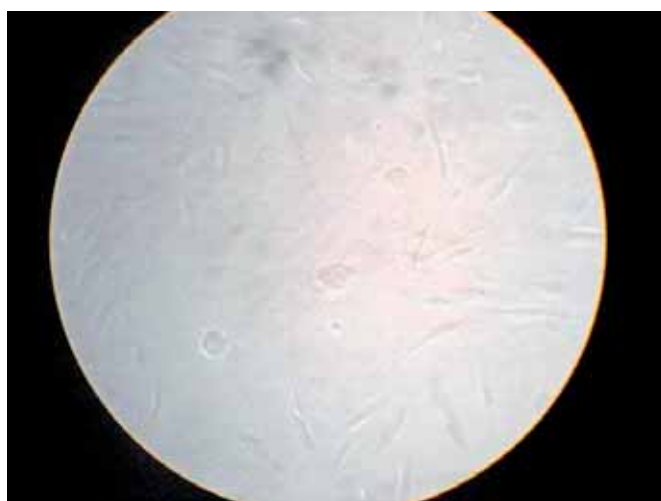


Fig.4. Células colocadas en placas e incubadas durante un periodo de 21 a 28 días, hasta obtener confluencia.
As células foram plaqueadas e incubadas por um periodo de 21 a 28 dias, até se obter a confluência acima.

Áreas Donantes	Rendimiento Celular (x10 ³)/ml de tejido lipoaspirado	Sexo	Edad (Años)	Índice de Masa Corporal (IMC)	Viabilidad (%)
Ginecomastia	8	M	68	29	93
Abdomen	8	M	68	29	92
Abdomen	10	F	56	25	94
Abdomen	7	F	40	24	95
Abdomen	6	F	38	22	92
Flanco	6	F	40	24	91
Flanco	9	F	38	22	93
“Cartuchera”	7	F	40	24	91
“Cartuchera”	8	F	38	22	92
Cara interna del muslo	6	F	38	22	91
Cara Posterior del brazo	5	F	56	24	91
Cara Posterior del brazo	6	F	54	24	92
Medias±DP	7,2±1,3		45±13	24±3	92±1,3
Intervalo	5-10		38-68	22-29	91-95

Tabla I.

nal de 21 a 28 días, hasta que se obtuvo confluencia (Fig.4).

Resultados

Los lipoaspirados de tejido adiposo subcutáneo obtenidos de 21 áreas donantes (en un total de 7 pacientes sometidos a liposucción electiva) fueron divididos en 12 muestras y procesados a través de digestión por colagenasa y centrifugación diferencial.

El rendimiento medio de las células de FVE fue de 7,2 +/- 1,3 x 10³ células por mililitro de tejido lipoaspirado (Tabla I). En la época de la recolección, esas células presentaban una viabilidad de 92 +/- 1% basada en exclusión por Azul de Trypan.

Discusión

Se acepta comúnmente que las células madre y las células precursoras están relacionadas con el mantenimiento continuo y la reparación de la mayoría de los tejidos. Teniendo en consideración que las células madre tienen capacidad de autorrenovación y de diferenciación en múltiples linajes, éstas células son de primordial importancia para el organismo, no solo durante su desarrollo, sino también durante su madurez, con respecto a la homeostasis celular.

El medio óptimo para la obtención de células de FVE supone un importante desafío en la actualidad. Tras el estudio preliminar que hemos presentado,

podemos sacar en conclusión que el rendimiento de las células obtenidas a partir del tronco humano (ginecomastia – 8,0; abdomen – 7,75; flancos – 7,5) representa una media final de 7,75 x 10³ /ml de grasa lipoaspirada, mientras que en el caso de los miembros (“cartucheras” – 7,5; cara interna de los muslos – 6,0; brazos – 5,5), el rendimiento final fue de 6,3 x 10³ /ml de grasa lipoaspirada.

Conclusiones

De acuerdo con los datos obtenidos del estudio, las áreas donantes preferidas para obtener un rendimiento 22% mayor de células de FVE se localizan en el tronco, que representa ser por tanto una mejor fuente de células madre que los miembros.

Todos estos datos, aunque preliminares, ya han influido en nuestra elección de áreas donantes de preferencia para la realización de lipoinjertos, corroborando de esta manera los hallazgos obtenidos. Continuamos realizando estudios con marcadores celulares para comprobar la descendencia de las células madre transferidas y su rendimiento a partir de diversos grupos de portadores de lipodistrofias, así como el empleo de variadas metodologías, lo cual será objeto de presentaciones futuras.

AGRADECIMIENTOS

Queremos agradecer a la Fundación de Ayuda a la Investigación del Estado de São Paulo (Fapesp) y al

Consejo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico (CNPq) por su apoyo financiero. También a Guilherme Flosi Stocchero, estudiante de cuarto año de la Facultad de Medicina de la Universidad de São Paulo, por su ayuda en la revisión y redacción de este artículo.

Dirección del autor

Dra. Katia Aparecida Almeida
Avda. Dr. Lineu Prestes 580-Bloco 17
Laboratório de Bioquímica Clínica
055080-900 São Paulo, Brasil
e-mail: katiacidi@yahoo.com

Bibliografía

1. **Montón J. Y Cols.:** "Experiencia clínica en el empleo de factores de crecimiento autólogos obtenidos de plasma rico en plaquetas". *Cir. plást. iberolatinoam.* 2007, 33 (3): 155.
2. **Planas J. Y Cols.:** "Supervivencia a largo plazo de los injertos grasos". *Cir. plást. iberolatinoam.* 2006, 32 (1): 26
3. **Serra Renón y Cols.:** "Uso de Factores de Crecimiento Plaquetar unidos a injertos de grasa para lipofilling facial en ritidectomía". *Cir. plást. iberolatinoam.* 2006, 32 (3): 191.
4. **Ogawa R., Mizuno H., Watanabe A., Migita M., Shimada T., Hyakusoku:** "Osteogenic and chondrogenic differentiation by adipose-derived stem cells harvested from Gfp transgenic mice". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004, 313: 871.
5. **Safford KM., Hicok KC., Safford SD.:** "Neurogenic differentiation of murine and human adipose-derived stromal cells". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2002, 294: 371.
6. **Zuk PA., Zhu M., Ashjian P., De Ugarte DA., Huang JI., Mizuno H., Alfonso ZC, Fraser JK., Benhaim P., Hedrick MH.:** "Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells". *Mol. Biol. Cell* 2002, 13: 4279.
7. **Zuk PA., Zhu M., Mizuno H., Huang J., Futrell JW., Katz AJ., Benhaim P., Lorenz HP., Hedrick MH.:** "Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies". *Tissue Eng.* 2001, 7: 211.
8. **Gimble JM., Guilak F.:** "Adipose-derived adult stem cells: isolation, characterization and differentiation potential". *Cytherapy* 2003, 5: 362.
9. **Hauner H., Enterenmann G., Wabitsch M., Gaillard D., Ailaud G., Negrel R., Pfeiffer EF.:** "Promoting effect of flucocorticoids on the differentiation of human adipocyte precursor cells cultured in a chemically defined medium". *J. Clin. Invest.* 1989, 84: 1663.
10. **Katz AJ., Tholpady A., Tholpady SS.:** "Cell surface and transcriptional characterization of human adipose-derived adherent stromal (Hadas) cells". *Stem cells* 2005, 23: 412.
11. **Miranville A., Heeschen C., Sengenès C., Curat CA., Busse R., Bouloumie A.:** "Improvement of postnatal neovascularization by human adipose tissue-derived stem cells". *Circulation* 2004, 110: 349.
12. **Mitchel JB., Mcintosh K., Zvonic S., Garret S., Floyd ZE., Kloster A., Dihalvorsen Y., Storms RW., Goh B., Kilroy G., Wu X., Gimble JM.:** "Immunophenotype of human adipose-derived cells: temporal changes in stromal-associated and stem cell-associated markers". *Stem cells* 2006, 24: 376.
13. **Rodbell M.:** "Metabolism of isolated fat cells. Effects of hormones on glucose metabolism and lipolysis". *J. Biol. Chem.* 1964, 239: 357.

Copyright of Cirugía Plástica Ibero-Latinoamericana is the property of Cirugia Plastica Ibero-Latinoamericana and its content may not be copied or emailed to multiple sites or posted to a listserv without the copyright holder's express written permission. However, users may print, download, or email articles for individual use.