

CRIOPRESERVACION DE LAS CELULAS MADRE PROVENIENTES DEL TEJIDO GRASO OBTENIDO MEDIANTE LIPOSUCCION

Dr. Jorge Planas

INTRODUCCIÓN

Tradicionalmente las células madre han sido clasificadas según sus propiedades de diferenciación en dos tipos: Pluripotentes (embrionarias) que pueden diferenciarse en cualquier tipo de célula del cuerpo y multipotentes (adultas) que pueden diferenciarse en múltiples, pero no en todos los linajes celulares (3-16).

Dentro de las células madre adultas se han descrito diferentes tipos. Las más conocidas y empleadas en la clínica desde hace tiempo son las células madre hematopoyéticas de médula ósea (3-6-8). En la misma médula, aunque también en sangre de cordón umbilical, en sangre periférica y en la grasa corporal existen las células madre mesenquimales, que pueden diferenciarse en numerosos tipos de células de los tres derivados embrionarios(15-16) (musculares, vasculares, nerviosas, hematopoyéticas, óseas...).

Estas células madre mesenquimales son las más importantes de almacenar para futuras aplicaciones clínicas.

La médula ósea contiene: 0,001 -0,01% de MSCs y la grasa abdominal un 5% de MSCs. Para obtener cantidades iguales de células madre mesenquimales presentes en 1 gramo de tejido adiposo, se necesitan 500 gramos de médula ósea.(17)

El tejido adiposo contiene mayor número de MSCs. y su extracción resulta más sencilla y menos agresiva para el paciente.(9-16)

La liposucción se presenta como la técnica más efectiva para extraer la suficiente cantidad de grasa que se necesita para la obtención de células MSCs. Se creó un sistema validado y estéril de extracción, envase y transporte de la grasa a un laboratorio.

Se trata de una liposucción convencional, con el valor añadido de que parte de la grasa que se extrae se envía a un laboratorio para aislar, cultivar y conservar células madre mesenquimales. Este procedimiento se lleva a cabo en paralelo con la liposucción, sin ningún inconveniente para el paciente, siendo el tiempo quirúrgico y postoperatorio exactamente igual al de una liposucción normal.

Las MSCs. obtenidas de tejido graso aspirado, poseen una alta capacidad de diferenciación en adipocitos, osteocitos, condrocitos y miocitos demostrado por numerosos estudios previos (2-7-13-20-21) Además las células grasas de linaje específico (CD44+/45-/73+/90+) pueden ser conservadas a baja temperaturas por largos periodos de tiempo manteniendo todo su potencial (11-14-19) hasta el momento de ser necesitados por el paciente.

Las células madre se emplean en medicina regenerativa y se espera que en un futuro más o menos próximo se puedan utilizar en el tratamiento de enfermedades como la diabetes, enfermedades cardiovasculares, lesiones medulares y enfermedades neurológicas. (21).

MATERIALES Y MÉTODOS

-Recolección del tejido adiposo: Hemos realizado la recolección del tejido graso de 36 pacientes de ambos sexos, en los cuales estaba indicado una liposucción como método para remodelación corporal y/o extracción de los acúmulos de grasa no deseados. Dicho procedimiento se llevó a cabo bajo anestesia general y mediante la utilización de liposucción convencional.

Todas las intervenciones fueron realizadas en la Clínica Planas (Barcelona) durante el año 2007. Se preparó el tejido graso mediante infiltración con solución fisiológica y adrenalina en concentración (1mg.-1.000.000) de las diferentes áreas a tratar, siendo las más frecuentes: abdomen, flan-

cos, trocánteres y cara interna de muslos. La extracción de tejido adiposo se realizó mediante la utilización de un sistema cerrado sin contacto con el exterior, estéril, con aspiración a baja presión (media atmósfera) y utilizando cánulas de punta roma tipo mercedes (3mm.) de un solo uso. El tejido graso aspirado total, fue colectado en una bolsa estéril, en una cantidad aproximada de 150 a 200 cc. por paciente y bolsa.

-Envase, preparación y envío: La bolsa colectora se identificó con los datos del paciente mediante el uso de etiquetas con códigos de barra y se introdujo dentro de otra bolsa para su protección. Todo el pack descrito junto con un resumen de la historia clínica del paciente se colocó dentro de una caja de porexpan con medios de reservorios térmicos tipo cool-pack, que mantienen la temperatura del tejido hasta su llegada al laboratorio para su procesado. Cada caja se envió al laboratorio para ser manipulada dentro de las 30 horas siguientes a la extracción.

-Criopreservación del tejido adiposo: Una vez la muestra llegó al laboratorio, se decantó durante 30 minutos y el tejido graso se separó en tres fracciones

1- Inferior: fluido de liposucción (fluido rojo)

2- Media: procesado de lipoaspirado (amarillo)

3- Superior: fluido oleoso (ámbar)

La fracción media amarilla (FMA) es la utilizada para su crio-preservación en un banco de tejidos y su posterior procesado para obtención de células madre.

Se realizaron diferentes test de protocolos de criopreservación para seleccionar el más adecuado, siendo el método escogido para su mejor conservación, la congelación lenta controlada hasta conseguir la vitrificación homogénea de 50 ml de preparado del tejido graso + glicerol 10% + 1% de albúmina humana+ 0.1M sacarosa en solución fisiológica, en cryobag.

-Procesado y cultivo del tejido graso para obtención de células madre mesenquimales:

1. Se identificaron las células madre mesenquimales mediante tres criterios:

a. Buena adherencia y crecimiento celular

b. Inmuno-fenotipo adecuado. (CD44-45-73-90; estos marcadores definen una célula madre mesenquimal multipotencial)

c. Diferenciación en células adultas. (capacidad de diferenciación en osteocitos, condrocitos y adipocitos)

2. Criopreservadas / descongeladas: estudiar si han sufrido cambios y ver su viabilidad. (Fig. 1 – Fig. 2)

El tejido adiposo criopreservado es descongelado rápidamente en baño de agua tibia a 37 °C Después de la digestión enzimática con colagenasa tipo 1, las células del FMA en un medio de cultivo a 5% CO₂, 20% de O₂ y el 100% de humedad.

Las células madre mesenquimales se descongelaron y se analizó la recuperación de la célula, la vitalidad y la presencia de marcadores de membrana.

Se obtuvo una correcta recuperación de la célula, de su vitalidad y se encontraron la presencia de marcadores de membrana específicos.

3. Se comprobó que había suficiente número de MSCs al final del cultivo.(el número mínimo de MSCs al final del cultivo debe ser de 20 x 10⁶). Se determinó que 60cc. de grasa eran suficientes para obtener dicha cantidad



Fig.1: Proceso de criopreservación;



2: Identificación de las MSCs. en laboratorio.

DISCUSIÓN

El tejido adiposo es uno de los tejidos más abundantes del cuerpo humano, su acceso es sencillo, el proceso de extracción es fácil de realizar y en la mayoría de las personas es posible extraer suficiente grasa sin perjuicio estético alguno (21).

Además el tejido graso contiene 500 veces más número de células madre mesenquimales que la médula ósea (12-15), además de que la morbilidad para su obtención es evidentemente mucho menor.

La liposucción es uno de los procedimientos más comunes en nuestra especialidad. La grasa extraída, a no ser que se utilice en el mismo acto operatorio para realizar un lipofiling o lipoestructura, es desechada en su totalidad. Es por ello que resulta muy coherente proponer al paciente su conservación para posibles futuras aplicaciones médicas.

Aunque para el estudio de validación del proceso fue necesario extraer 200cc de cada paciente, en la actualidad solo se precisan extraer 60cc. de grasa para su almacenamiento.(Fig. 3) Esto hace que incluso haya pacientes que acudan a la consulta para extraer esa pequeña cantidad de grasa de forma ambulatoria con un fin no estético de remodelación del área donante sino con el objetivo de almacenarla.

Las aplicaciones futuras de las células madre en medicina regenerativa son cada día mas evidentes y parecen mas cercanas.

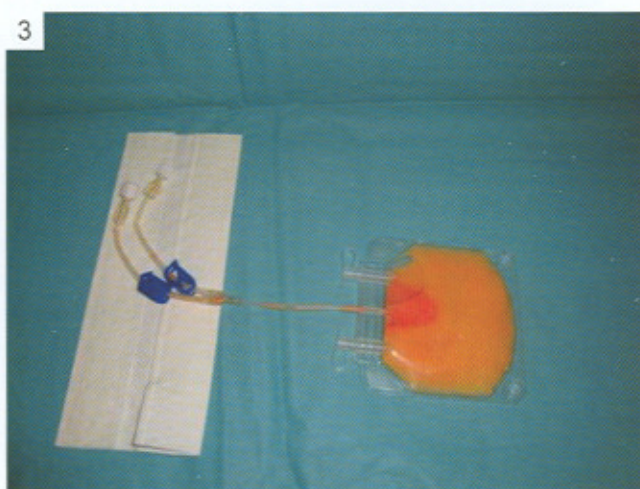


Fig.3: La cantidad de grasa que actualmente se necesita para disponer de suficientes MSCs. para su almacenamiento es de 60 cc.

CONCLUSIONES

El tejido adiposo es una de las principales fuentes de células madre mesenquimales, que pueden diferenciarse hacia linajes específicos tales como adipogénico, condrogénico, osteogénico, miogénico y neurogénico [10,15-19].

El tejido adiposo es uno de los tejidos más abundantes del cuerpo humano, su acceso es sencillo, el proceso de extracción es fácil de realizar y en la mayoría de las personas es posible extraer suficiente grasa sin perjuicio estético alguno [21].

La liposucción es uno de los procedimientos más realizados en cirugía estética y, aunque su objetivo original consiste en retirar la grasa no deseada modelando la figura, actualmente puede establecerse como el método ideal de obtener MSCs. autólogas para futuras aplicaciones.

Aunque para la validación de esta técnica de extracción, transporte y criopreservación de células madre obtenidas de grasa de aspirado de liposucción se precisaron obtener 200cc. de grasa de cada paciente, para la actual utilización de dicha técnica solo se precisan 60cc.

Esta técnica está validada por las leyes europeas y cuenta con un instrumental especialmente adaptado que permite la manipulación del tejido adiposo sin alterar las propiedades que se necesitan para la obtención de células madre.

BIBLIOGRAFÍA

1. Ashjian P.H., Elbarbary A.S., Edmonds B., Deugarte D., Min Z., Zuk P., Lorenz H.P., Benhaim P., Hedrick M.H. In vitro differentiation of human processed lipoaspirate cells into early neural progenitors. *Plastic and reconstructive surgery*, 111, 1922-1931, (2003).
2. Bunnell B.A., Deng W., Robinson C.M., Waldron PR, Bivalacqua TJ, Baber SR, Hyman AL, Kadowitz PJ. Potential application for mesenchymal stem cells in the treatment of cardiovascular diseases. *Canadian journal of physiology and pharmacology*, 83,529-539, (2005).
3. Bjorn Behr, Sae Hee Ko, Victor W Wong, Geoffrey C. Gurtner. Michael T. Longaker. "Stem Cells". *Plast. Reconstr. Surg.* 126: 1163, (2010).
4. Coleman, S. R. Structural fat grafts: The ideal filler? *Clin Plast. Surg.* 28: 111, (2001)
5. Coradeghini R, Guida C, Sanguineti R, Bassi AM, Parodi A, Santi PI, Raposio E. A comparative study of proliferation and hepatic differentiation of human adipose-derived stem cells. *Cells Tissues Organs.* 191(6):466-77 (2010).
6. DeUgarte, D. A., Morizono, K., Elbarbary, A., et al. Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow. *Cells Tissues Organs* 174: 101 (2003).
7. Grigorriadis A.E., Heersche J.N., Differentiation of muscle, fat, cartilage, and bone from progenitor cells present in a bone-derived clonal cell population: Effect of dexamethasone. *J cells Biol*; 106:2139-2151(1988),
8. Hal E. Broxmeyer, Edward F. Srour, Gao Hangoc, Scott Cooper, Stacie A. Anderson and David M. Bodine. High-efficiency recovery of functional hematopoietic progenitor and stem cells from human cord blood cryopreserved for 15 years. *PNAS* vol 100 n°2, 645-650 (January 2003).
9. Jezierska-Wozniak K, Nosarzewska D, Tutas A, Mikolajczyk A, Oklinski MK. Use of adipose tissue as a source of mesenchymal stem cells. *Postepy Hig Med Dosw (online)* 27;64:326-32 (jul 2010).
10. Lee L. Q. Pu, M.D. Betsy F. Fink, B. Sc. Dayong Gao, Ph. D, Henry C. Vasconez, M.D. Adipose Aspirates as a source for Human Processed Lipoaspirate Cells after Optimal Cryopreservation
11. MH Kim, I Kim, S-H Kim, MK Jung, S Han, JE Lee, J-S Nam, S-K Lee and SI Bang. Cryopreserved human adipogenic-differentiated pre-adipocytes: a potential new source for adipose tissue reneration. *Cryotherapy* vol. 9, n° 5, 468-476. (2007).
12. Mizuno H, Hyakusoku H. Fat grafting to the breast and adipose-derived stem cells: recent scientific consensus and controversy. *Aesthet Surg j.* 30(3):381-7 (May 2010).
13. Mizuno H., Zuk, PA., Zhu, M. Myogenic differentiation by human processed lipoaspirate cells. *Plast. Reconstr. Surg.* 109.: 199, (2002).
14. Moscatello D.K., Dougherty M., Narins R. S., Lawrence N. Cryopreservation of human fat tissue augmentation: viability requires use of cryoprotectant and controlled freezing and storage, *Dermatol. Surg.* 111:141-147 (2005).

15. Niemeyer N., Kornacker M., Mehlhorn A.T., Seckinger A., Vohrer J., Schmal H., Kasten P., Eckstein V., Sudkamp N.P., Krause U. Comparison of immunological properties of bone marrow stromal cells and adipose tissue-derived stem cells before and after osteogenic differentiation in vitro. *Tissue Engineering*, 13, 111-121,(2007).
16. Pineda M. C., Londono P. C. Obtencion de celulas madre del tejido adiposo y su potencial de diferenciacion osteogenico. *Revista Ingenieria Biomedical*, vol. 3, num. 5, pags. 58-65 (Enero 2009).
17. Pittenger et al, *Curr Microbiol Immunol* 251:3-11 (2000)
18. Kimberly J. Butterwick, MD, Avery A. Bevin, MD, and Shilesh Iyer. Fat Trasplation Using Fresh Versus Frozen Fat: A Side-by-Side Two-Hand Comparison Pilot Study.
19. X.D. Cui, D. Y. Gao, B.F. Fink, H.C. Va scone, L.L.Q. Pu. Cryopreservation of human adipose tissues. *Cryobiology* 55: 269-278. (2007). yoshimura et al 2006)
20. Yoshimura K, Asano Y., Aoi N., Kurita M., Oshima Y., Sato K et al Progenitor-enriched adipose tissue transplantation as rescue for breast implant complications. *Breast J.* 16(2):169-75 (Nov 2009).
21. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 7:211-28 (2001).

NOTIZIE AUTORI CONTRIBUTI SPECIALI

**Dr. Jorge Planas Ribó**

Private Hospital: **Clínica Planas**
 Street: Pere de Montcada, 16
 08034- Barcelona (Spain)
 Phone number: 34 93 203 28 12
 Fax: 34 93 205 70 18
 E-mail: jorge@clinica-planas.com
 www.clinica-planas.com

Procedure: Plastic surgery.

Curriculum vitae

Speciality: Plastic, Reconstructive and Aesthetic Surgery, University "Tor Vergata", Roma

Degree: Faculty of Medicine: University of Córdoba, Spain, 1989.

Formation: Managing Medical director deputy of the Clínica Planas Barcelona and Planas Day Madrid.

Affiliations

- Member of the teaching staff of the Official Plastic Surgery Course. Corso di insegnamento integrativo di "Applicazioni biotecnologiche in Chirurgia estetica". Università Tor Vergata de Roma, since 2000.
- Member of the teaching staff of the Doctorate Courses in Plastic Surgery, Department of Surgery of the Autonomous University of Barcelona (UAB), since 1992.
- Member of the teaching staff of the University Diploma Course in Mammary Pathology – University Masters in Mammary Pathology - Senology, of the University of Barcelona (UB), since 1993. Spanish Society of Plastic, Reconstructive and Aesthetic Surgery (SECPRE). Catalanian Society of Plastic and Aesthetic Surgery International Society of ultrasonic Surgery (ISUS). European Society of Antiaging Medical Specialists (ESAAMS)
- Member of the board of the African Medical Research Foundation (AMREF). Associated Surgeon of the African Medical Research Foundation (AMREF). Founder member of the Spanish Society of Antiaging and Longevity (SEMAL).
- General Secretary of the Spanish Society of Antiaging and Longevity (SEMAL) (2002-2010).
- Corresponding Participant of the American Society for Aesthetic Plastic Surgery (ASAPS).

Publications

- "The Use of Methyl Methacrylate to Repair Skull Defects". Abstract 10th Congress of the International Confederation for Plastic and Reconstructive Surgery IPRS Vol. II 1992.
- "Nostril and Alar Reshaping". *Aesthetic Plastic Surgery*. 17:139-150, 1993.
- "The Combined Technique: Ultrasonic Liposculpture with Superficial Liposuction". Abstract del II Simpósio Internacional de Atualização em estética da pele. Sao Paulo. Brazil. May 1994.
- "Current after effects in Lipoplasty". Abstract from the 24th National Meeting of the Spanish Society of Plastic, Reconstructive and Aesthetic Surgery. 1994.
- "The Combined Technique: Superficial Liposuction with Ultrasonic Liposculpture". *Advances in Plastic and Reconstructive Surgery*. Vol. II 1995.
- "Salvaging the Exposed Mammary Prosthesis". *Aesthetic Plastic Surgery*. 19:535-540, 1995.
- "Treatment of Gynaecomastia". Abstract from the 8th National Congress of the Spanish Society of Plastic, Reconstructive and Aesthetic Surgery. 1995.
- "Touch-ups in Liposuction". Abstract from the 8th National Congress of the Spanish Society of Plastic, Reconstructive and Aesthetic Surgery. 1995.
- "Calf prosthesis. 5 Years Experience". Abstract from the 8th National Congress of the Spanish Society of Plastic, Reconstructive and Aesthetic Surgery. 1995.
- "Chemical Peelings: Patient management, Prevention and Treatment of Side Effects". *Dermatología*. Argentina. Vol. II, No. 2. 1996.
- "Transconjuntival Blepharoplasty". Abstract from the 31st Congress of the Spanish Society of Plastic, Reconstructive and Aesthetic Surgery. 1996.
- "Change in focus of the surgical indication for pendulum abdomen".

- Abstract from the 31st Congress of the Spanish Society of Plastic, Reconstructive and Aesthetic Surgery. 1996.
- "Criteria for the Reconstruction of the Musculoaponeurotic Abdominal Wall". Abstract from the 31st Congress of the Spanish Society of Plastic, Reconstructive and Aesthetic Surgery. 1996.
- "Long Term Results with the Planas reduction mammoplasty technique". Abstract 14th ISAPS Congress. 1997.
- "Transconjunctival blepharoplasty associated with laser". Revista de Barcelona Centro Médico (Journal of the Barcelona Medical Centre), no. 10. November 1997.
- "External Ultrasonic Treatment of capsular contractures in breast implants". Aesthetic Plastic Surgery. 21: 395-397, 1997.
- "Modified Phenol Peeling Versus Laser". Abstract 33rd National Congress of the Spanish Society of Plastic, Reconstructive and Aesthetic Surgery. May, 1998.
- "Prevention of contracture of cutaneous grafts". Worldplast Vol. 2, No. 2, 1998.
- "Virtual Changes of The Shape of the Lips". Aesthetic Plastic Surgery. 23: 32-35, 1999.
- "New Indications in the Approach of the Pendulous Abdomen". Aesthetic Plastic Surgery. 23: 267-270, 1999.
- "Gluteal Prostheses". Cirugía Plástica Iberoamericana. Vol. 27- no. 3 2001.
- "Five-Year Experience on Ultrasonic Treatment of Breast Contractures". Aesthetic Plastic Surgery. 25: 89-93, 2001.
- "Prophylactic use of External Ultrasonid for Breast Implant Capsular Contracture". Aesthetic Surgery Journal. 22:205-207.
- "Five-Year Experience in the Treatment of Capsular Contractures with External Ultrasound". Barcelona Centro Médico (Barcelona Medical Centre) no. 18, June 2002.
- "Facial and Corporal Lipostructure. Antiaging Medicine" N° 1: 46-47, 2003
- "Treatment of Periprotetic Capsular Contracture" Chapter of "Plastic Mammary Surgery " (XXXVIII Congress of the SECPRE. Editorial MIC, June 2003.
- "Commentary to the work "Infiltración grasa en pérdida de sustancias traumáticas"" Cirugía Plástica Iber.Latin. Amer. Vol. 31- no. 1-2005.
- "Long Term Survival with Fat Grafting" Cirugía Plástica Iber.Latin.Amer. Vol. 32- no. 1-2006.
- "Commentary to the work "Uso de factores de crecimiento plaquetar unidos a injertos de grasa para lipofilling en ritidectomía"" Cirugía Plástica Iber. Latin. Amer. Vol. 33 – no. 1-2007.
- Abstract "Rinoplastia Primaria: Utilización de matriz ósea con factor de crecimiento plaquetario en rinoplastia". XLII Congress of the Spanish Society of Plastic, Reconstructive and Aesthetic Surgery. May 2007.
- Abstract "Adipose tissue, a rich source of adult mesenchymal stem cells for clinical use". Planas J., Wouters G. XVI International Course. Clínica Planas. May 2008.

Published books

- " Plastic Mammary Surgery " - SECPRE - Editorial MIC - Year 2003.
- "Aesthetic Surgery for Plastic Surgeons" - SECPRE - Editorial) Rabapress, S. L. – 2004 October.
- "Cirugía Estética sin trampa ni cartón" Dr. Jorge Planas Ribó – Editorial Martínez Roca, S.A. - February 2005.

Congress, Courses and Conferences

He has participated in 112 several Congress and Courses until 2005 November, 43 as Organiser, 63 as lecturer and he has made about 200 conferences.

Other distinctions

Golden Cross of the Spanish Association of European Foment 2006.