

Obtención y criopreservación de células madre del tejido graso mediante liposucción

Collecting and criopreservation of stem cells obtained by liposuction from fat tissue



Planas Ribó, J.

Planas Ribo, J.*, Coronel Gagliardi, R. **

Resumen

Existen diferentes técnicas para la obtención directa de células madre embrionarias a través de embriones criopreservados en nitrógeno líquido (-196 °C), blastómeros individuales, activación de ovocitos por transferencia nuclear y células madre del líquido amniótico. También es posible obtener células madre adultas hematopoyéticas y de la médula ósea, más conocidas y empleadas en la clínica desde hace tiempo, así como también de la sangre del cordón umbilical en recién nacidos y de la grasa corporal en adultos.

La grasa autóloga corporal extraída mediante liposucción se reutiliza en ocasiones para injertar o infiltrar otras zonas corporales y faciales como material de relleno, pero en la mayoría de los casos es desechada. Por lo general, para obtener un resultado satisfactorio en el trasplante de grasa autóloga, son necesarios varios tiempos quirúrgicos por lo que sería muy útil contar con un banco de tejido adiposo personalizado. Existen diferentes estudios que demuestran que el tejido adiposo aspirado por liposucción convencional puede preservarse y almacenarse con éxito a baja temperatura (-85 °C) en banco de tejido para futuras aplicaciones.

Las células madre mesenquimales (MSCs) poseen gran capacidad de proliferación y diferenciación con un alto valor terapéutico. El tejido graso es un reservorio importante de MSCs capaces de diferenciarse en tejido óseo, cartilaginoso, muscular, etc. Si reservamos una pequeña cantidad del tejido graso lipoaspirado, podemos obtener una cantidad suficiente de MSCs y conservarlas mediante un método óptimo de criopreservación.

En 2007 realizamos un estudio de la grasa lipoaspirada en 36 pacientes para demostrar y validar el método de obtención de tejido graso con su posterior traslado, manipulación y criopreservación en banco de células madre. Los resultados fueron satisfactorios y en junio del 2010 se validó el método de recogida, procesamiento y almacenamiento de una mezcla enriquecida de células madre adultas de tejido graso aspirado. Dicho método permite a todas aquellas personas que no hayan tenido la oportunidad de almacenar su cordón umbilical al nacer, almacenar MSCs obtenidas de la grasa de liposucción.

La criopreservación conservará las células durante años que, en el momento de ser requeridas por el paciente, se descongelarán, pudiéndose recuperar alrededor del 80% de las mismas.

Palabras clave Células madre, Liposucción, Criopreservación.

Código numérico 19-266

Abstract

There are different techniques to obtain embryonic stem cells directly through cryopreserved embryos in liquid nitrogen (-196°C), individual blastomeres, ovocyte activation by nuclear transfer and stem cells from amniotic fluid, among others. It is also possible to obtain hematopoietic adult stem cells and those from the bone marrow, better well-known and used in clinics for a long time; besides, from the blood of umbilical cord in newborns and body fat in adults.

The autologous fat extracted from the body using liposuction, is sometimes reused to inject or infiltrate other body and facial areas as a filling material, but in most of the cases, it is thrown away. Sometimes it's necessary to perform several surgical operations; therefore, it would be very useful to count on a bank of personalized adipose tissue. There are different studies that demonstrate that adipose tissue obtained through conventional liposuction can be preserved and stored successfully at a low temperature (-85 °C) in a tissue bank for a future use.

Mesenchymal stem cells (MSCs) are those with a high capacity of proliferation and differentiation with a high therapeutic value. Fat tissue is an important reservoir of MSCs, able to be differentiated in osseous, cartilaginous, muscular, etc. tissues. Therefore, if we reserve a small amount of fat tissue obtained through liposuction, we can get the enough amount and preserve the MSCs with the best method of cryopreservation.

In 2007 we carried out a study of the fat obtained through liposuction in 36 patients, in order to demonstrate and validate a method for adipose tissue acquisition, with the subsequent transfer, manipulation and cryopreservation in a stem cells bank. The results were satisfactory, and in June 2010 the method for collecting, processing and storing an enriched adult stem cells mixture of sucked fat tissue was validated. This method gives the opportunity to anybody, who did not have the chance to store the umbilical cord when was just born, to keep stem cells from liposuction fat.

Cryopreservation will preserve stem cells during years and, when the patient requires them, they will be thawed, and about an 80 % of them recovered.

Key words Stem cells, Liposuction, Cryopreservation.

Numeral Code 19-266

* Cirujano Plástico y Director Médico.

** Cirujano Plástico

Clínica Planas. Barcelona, España.

Introducción

Las células madre se emplean actualmente 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 (1-15). Todo parece indicar que la medicina del futuro estará ligada a la medicina regenerativa y a la utilización de células madre autólogas. Es por esto que cientos de miles de personas almacenan hoy en día el cordón umbilical de sus hijos.

Pensamos cómo podríamos idear una técnica de almacenamiento de células madre de aquellos adultos que

no habían tenido la oportunidad de almacenar su cordón umbilical al nacer. Así nació la idea de validar un método de obtención, traslado y criopreservación de las células madre obtenidas de la grasa.

Dentro de las células madre adultas se han descrito diferentes tipos. Las más conocidas y empleadas clínicamente desde hace tiempo son las células madre hematopoyéticas de médula ósea (2,3). En la misma médula, aunque también en sangre de cordón umbilical, en sangre periférica y en la grasa corporal, existen células madre mesenquimales (Fig.1) que pueden diferenciarse en distintos linajes celulares embrionarios (musculares, vasculares, nerviosos, hematopoyéticos, óseos...) (9).

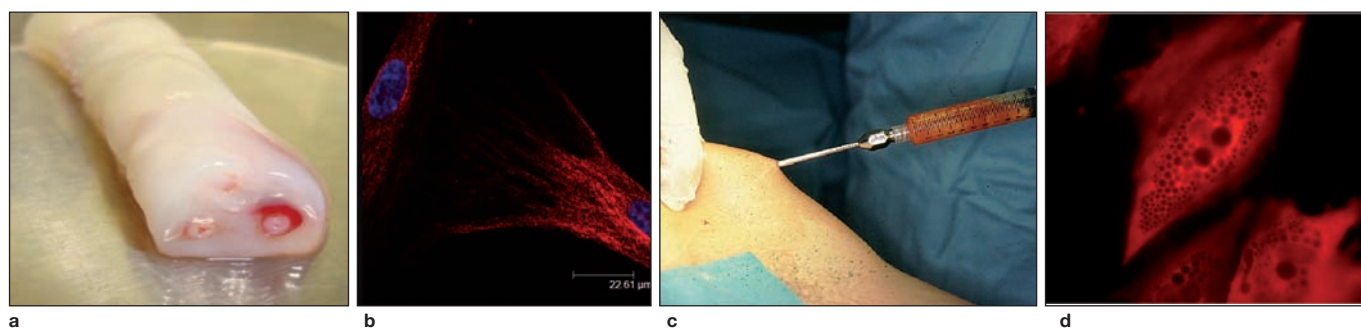


Fig. 1. (a,b) Cordón umbilical y MSCs provenientes del cordón; (c,d) Extracción y MSCs provenientes de la grasa

Las células madre mesenquimales (MSCs) 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 MSCs presentes en 1 gr. de tejido adiposo, se necesitan 500 gr. de médula ósea. Es por eso que el tejido graso es una excelente fuente de obtención de MSCs, ya que además de tener mayor número de ellas, su extracción resulta más sencilla y menos agresiva para el paciente frente a su obtención desde la médula ósea (4).

La liposucción es la técnica más efectiva para extraer la suficiente cantidad de grasa necesaria para obtener MSCs. Para ello, se creó un sistema validado y estéril de extracción, envase y transporte de la grasa al laboratorio (11). Se trata de llevar a cabo una liposucción convencional, con el valor añadido de que parte de la grasa que se extrae en ella se envía a un laboratorio para aislar, cultivar y conservar MSCs. Este procedimiento se lleva a cabo en paralelo con la liposucción, sin ningún inconveniente para el paciente, siendo el tiempo quirúrgico y postoperatorio empleados exactamente iguales a los de una liposucción convencional.

Las MSCs obtenidas de tejido graso aspirado poseen una alta capacidad de diferenciación en adipocitos, osteocitos, condrocitos y miocitos demostrada por numerosos estudios previos (7,14,15). Además las células grasas de linaje específico (CD44+/+/-/73+/90+) pue-

den ser conservadas a baja temperaturas durante largos periodos de tiempo, manteniendo todo su potencial (6,8,12,13) hasta el momento de ser reutilizadas en beneficio del paciente.

Las células madre se emplean en medicina regenerativa y se espera que en un futuro más o menos próximo se puedan utilizar como tratamiento para enfermedades tales como la diabetes, enfermedades cardiovasculares, lesiones medulares y enfermedades neurológicas (15).

Material y método

Recolección del tejido adiposo

Realizamos la recolección del tejido graso en 36 pacientes de ambos sexos en los que se había indicado una liposucción como método para remodelación corporal y/o extracción de los cúmulos de grasa no deseados. Dicho procedimiento se llevó a cabo en todos los casos bajo anestesia general y mediante la utilización de liposucción convencional (Fig. 2).

Todas las intervenciones fueron realizadas en la Clínica Planas (Barcelona, España) durante el año 2007. Previamente, preparamos el tejido graso de las zonas a tratar mediante infiltración con solución fisiológica y adrenalina en concentración 1mg.-1.000.000, siendo las más frecuentes: abdomen, flancos, trocánteres y cara interna de muslos.

La extracción de tejido adiposo se realizó mediante



Fig. 2: Extracción de la muestra en el transcurso de una liposucción convencional.

sistema cerrado, sin contacto con el exterior, estéril, con aspiración a baja presión (media atmósfera) y utilizando cánulas de punta roma tipo mercedes de 3mm. de diámetro y de un solo uso. El tejido graso aspirado se recolectó en una bolsa estéril, en una cantidad aproximada de 150 a 200 cc. por paciente y bolsa. Este sistema colector de grasa fue denominado Planas kit (Fig. 3).

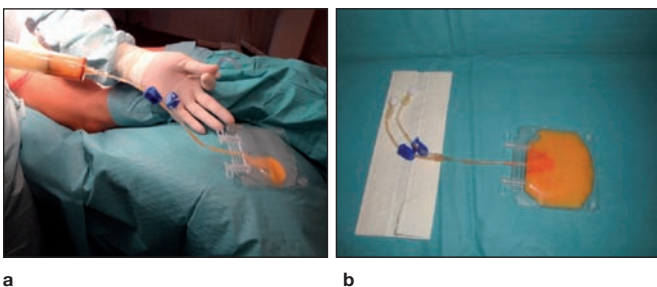


Fig. 3: (a) Colección de la grasa mediante el sistema Planas kit, (b) Bolsa colectorora llena

Envase, preparación y envío:

La bolsa colectora se identifica con los datos del paciente mediante etiquetas con código de barras y se introduce dentro de otra bolsa para su protección. Todo el paquete descrito, junto con un resumen de la historia clínica del paciente, se coloca dentro de una caja de porxpan con medios de reservorio térmicos a temperatura ambiente de quirófano entre 20-22 °C, tipo *cool-pack*, que mantiene la temperatura del tejido hasta su llegada al laboratorio para su procesamiento. Cada caja se envía

al laboratorio para ser manipulada dentro de las 30 horas siguientes a la extracción (Laboratorio Crio Save, Bélgica) (Fig. 4).

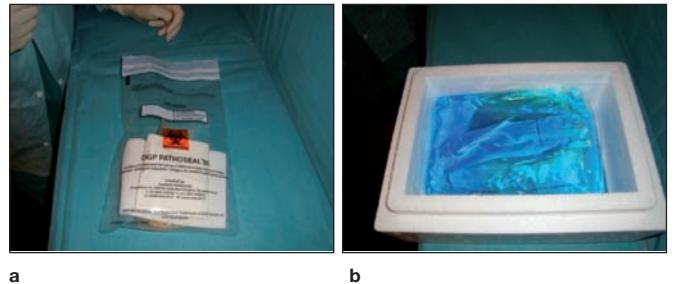


Fig. 4: (a) Protección e identificación de la muestra, (b) Caja preparada para envío.

Criopreservación del tejido adiposo:

Para el estudio de validación, evaluamos dos medios de congelación:

Medio 1: 10% glicerol + 10% FBS (suero bovino fetal) en solución fisiológica.

Medio 2: 10% glicerol + 1% albúmina humana + 0,1 sacarosa en solución fisiológica.

Controlamos durante el proceso de congelación lenta hasta la vitrificación de las diferentes muestras en criotubos de 50 ml la homogenización de la muestra entre el tejido graso y el medio estudiado, siendo el método escogido, por su mejor conservación, el medio 2.

Una vez que la muestra llega al laboratorio, se decanta durante 30 minutos y el tejido graso se separa en 3 fracciones (Fig. 5):

- 1- **Superior:** fluido oleoso (color ámbar)
- 2- **Media:** procesado del lipoaspirado (color amarillo)
- 3- **Inferior:** fluido de liposucción (color rojo)

La fracción media amarilla (FMA) es la utilizada para criopreservación en banco de tejidos o posterior procesado para obtención de células madre. La composición utilizada para almacenar y preservar tejido graso es 10ml de la fracción media + 10 ml del medio 2 de congelación (dilución).

Procesado y cultivo del tejido graso para obtención de células madre mesenquimales (MSCs):

1. Identificamos las MSCs mediante 3 criterios:
 - a. Buena adherencia y crecimiento celular.
 - b. Inmunofenotipo adecuado (CD44-45-73-90; estos marcadores definen una MSC multipotencial).
 - c. Diferenciación en células adultas (capacidad de diferenciación en osteocitos, condrocitos y adipocitos).
2. Criopreservación / descongelación: se estudia si han sufrido cambios y se comprueba su viabilidad.
3. Comprobamos que hay suficiente número de MSCs al final del cultivo.



Fig. 5: Muestra decantada en laboratorio durante 30 minutos.

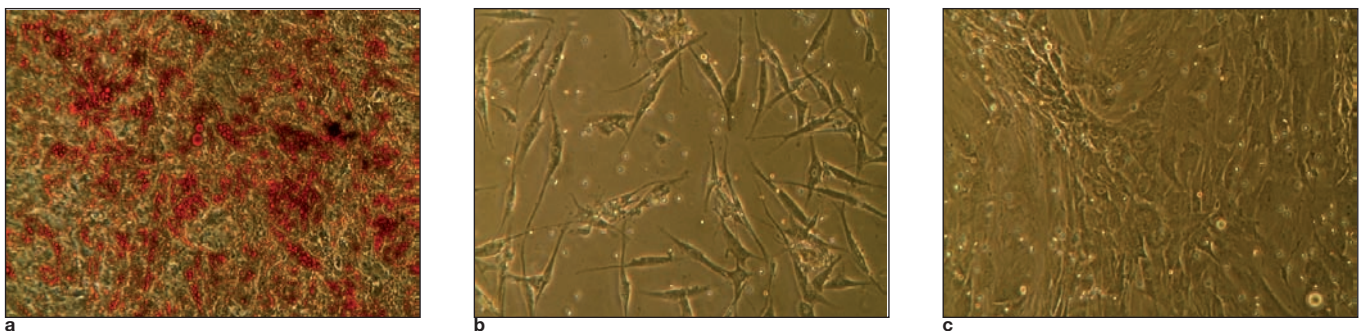


Fig. 6.- (a) Muestra en medio de cultivo, Imágenes de microscopía invertida (20X) (b) Dos días en medio de cultivo, (c) Seis días de cultivo.

marcadores forman los criterios mínimos para definir las células madre mesenquimales pluripotenciales (Sociedad Internacional para la Terapia Celular) (Gráfico1).

Hemos observado que el porcentaje de marcadores que identifican una célula MSC comparando el tejido fresco frente al criopreservado no varía significativamente: 97% en tejido fresco frente a 87% en el procesado.

Zona de Crecimiento - período de cultivo:

Comparando ambos tejidos grasos, fresco y congelado, se aprecia un número similar de MSCs por cm² de cultivo en un periodo medio de 15 días, entre 20x10⁶ y 100x10⁶.

Las MSCs cultivadas de descongelado FMA fueron criopreservadas con una densidad de 4x10⁶ células/cm² para almacenamiento a largo plazo.

Se determinó que 60cc. de grasa eran suficientes para obtener dicha cantidad (Fig. 7).

Crecimiento primario:

El tejido adiposo criopreservado se descongela rápidamente en baño de agua tibia a 37 °C.

Después de la digestión enzimática con colagenasa tipo 1, las células del FMA son cultivadas en un medio de cultivo de 5% CO₂, 20% de O₂ y 100% de humedad, en placa de cultivo (75 cm²) y visualizadas bajo microscopio invertido (Fig. 6).

Las células madre mesenquimales se descongelaron y analizamos su recuperación, su vitalidad y la presencia de marcadores de membrana. Obtuvimos una correcta recuperación de las células, de su vitalidad y encontramos presencia de marcadores de membrana específicos.

El número medio de MSCs de 10 ml recién procesados fue mayor en comparación con el número de células recuperadas tras la criopreservación, pero no fue significativamente diferente.

Marcadores de células madre mesenquimales:

Los marcadores característicos de las células fueron contados usando la FACSCAN de BD Biociencias. Hemos utilizado marcadores CD 44-45 -73-90; estos

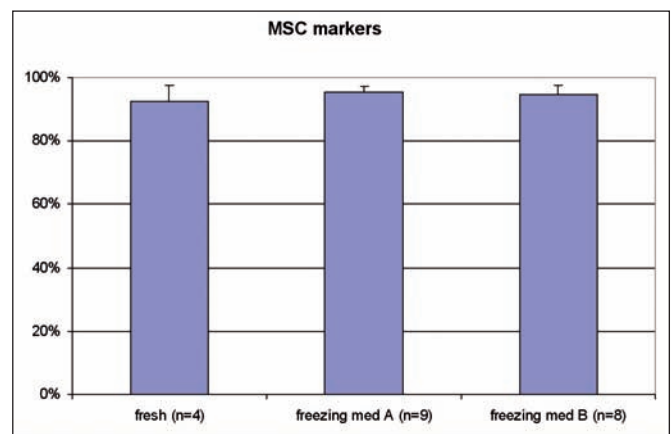


Gráfico 1: Comparativa de marcadores en tejido graso fresco y congelado

Diferenciación celular:

Además, estudiamos y analizamos la diferenciación de la célula madre proveniente de tejido graso hacia adi-



Fig. 7: Bolsa colectora con 60 cc. de grasa

pocitos, condrocitos y osteocitos, siendo necesarios para ello 21 días en medio de cultivo, renovando cada 3 días (Fig. 8).

Discusión

Diferentes grupos de investigación han realizado trabajos que permiten obtener células madre de distintos tejidos humanos, como médula ósea y cordón umbilical (3-9). En nuestro estudio, hemos obtenido MSCs directamente del tejido graso aspirado mediante liposucción, siendo esta técnica mucho más sencilla y menos agresiva para el paciente que otros métodos (7), y que por lo tanto, puede ser fácilmente incluida como una técnica más de práctica habitual dentro de nuestra especialidad.

A pesar de que existen muy pocos trabajos que utilizan el tejido graso como fuente de obtención de MSCs (1,3-5,7), en ninguno de ellos se hace referencia a un sistema seguro de embalaje y posterior traslado en condiciones óptimas para su criopreservación en banco de tejidos, así como para asegurar la supervivencia celular de cara a su posible posterior utilización terapéutica.

El tejido adiposo es uno de los tejidos más abundantes del cuerpo humano; su acceso es sencillo, el proceso para su extracción es fácil de realizar y en la mayoría de las personas, es posible extraer suficiente grasa sin perjuicio estético alguno (5,11).

Queda demostrado también por diferentes estudios

(6,8-10) que para obtener la misma cantidad de células madre en 1gr. de tejido graso se necesitan 500 gr. de tejido óseo; por lo tanto, la morbilidad asociada a su obtención desde el tejido graso es evidentemente mucho menor.

La liposucción es uno de los procedimientos quirúrgicos más comunes en nuestra especialidad. La grasa extraída mediante este método, a no ser que se utilice en el mismo acto operatorio para realizar un *lipofilling* 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 que presentamos en nuestro estudio fue necesario extraer 200cc. de cada paciente, en la actualidad solo se precisa extraer 60cc. de grasa para su almacenamiento. 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. En nuestra práctica, desde la validación del método hecha sobre 36 pacientes hasta la fecha de publicación de este trabajo, hemos puesto en marcha el procedimiento de extracción y almacenaje en una veintena de pacientes.

Conclusiones

El tejido adiposo es una de las principales fuentes de células madre mesenquimales (MSCs), que pueden diferenciarse hacia linajes específicos tales como adipogénico, condrogénico, osteogénico, miogénico y neurogénico.

El proceso para su extracción es fácil de realizar y en la mayoría de las personas es posible extraer suficiente grasa sin causarles perjuicio estético alguno.

El tejido graso obtenido mediante lipoaspiración puede preservarse intacto durante largo tiempo a fin de ser empleado luego como fuente para trasplante graso autólogo para aumento de tejidos en indicaciones estéticas y reparadoras.

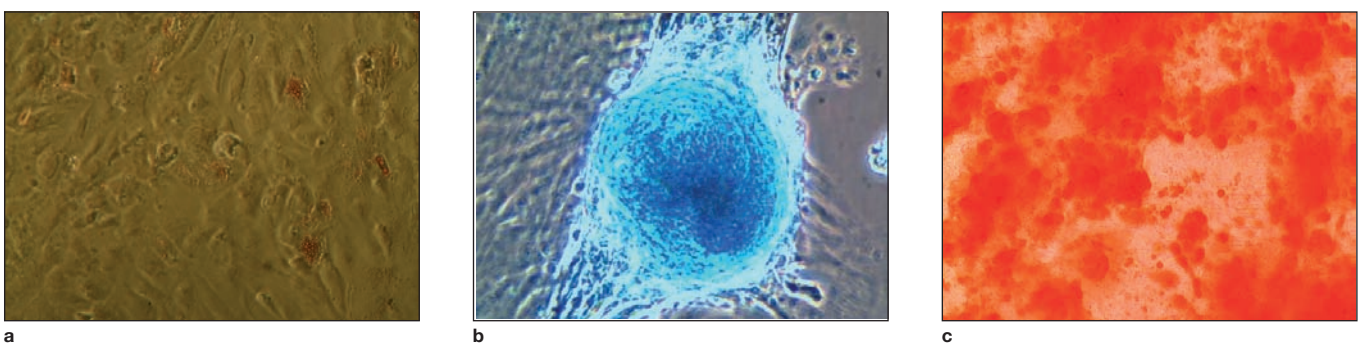


Fig. 8. (a) Adipocito diferenciado proveniente de SCMs de la grasa (Lípidos oil red 20X) (b) Condrocito proveniente de SMCs de la grasa (Proteoglicanos alcian blue 20X), (c) Osteocito diferenciado de smash de la grasa (Depósitos Ca aizarin red 20X).

Las células madre procedentes de lipoaspirado de tejido graso fresco en comparación con las procedentes del tejido criopreservado, se concluye que poseen similar número de marcadores específicos, densidad celular por cm² y lo más importante, la misma capacidad de diferenciación celular hacia linajes específicos, demostrada mediante el estudio presentado.

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

Dirección del autor

Dr. Jorge Planas Ribó
Clínica Planas
C/ de Pere II de Montcada 16
08034 Barcelona,
e-mail: jorge@clinica-planas.com

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. *Plast. Reconstr. Surg.* 2003, 111: 1922.
2. **Behr B., Sae Hee Ko, Wong VW, Gurtner GC., Longaker MT.:** Stem Cells. *Plast. Reconstr. Surg.* 2010, 126: 1163.
3. **DeUgarte, D. A., Morizono, K., Elbarbary, A., et al.:** Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow. *Cells Tissues Organs* 2003, 174: 101.
4. **Jeziarska-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) 2010, 27(64):326.
5. **Pu LLQ., Fink BF., Gao D., Vasconez HC.:** Adipose Aspirates as a source for Human Processed Lipoaspirate Cells after Optimal Cryopreservation. *Plast. Reconstr. Surg.* 2006, 117 (6): 1845.
6. **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* 2007, 9 (5): 468.
7. **Mizuno H., Zuk, PA., Zhu, M.:** Myogenic differentiation by human processed lipoaspirate cells. *Plast. Reconstr. Surg.* 2002, 109: 199.
8. **Moscattello 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.* 2005, 111:141.
9. **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*, 2007, 13: 111.
10. **Pittenger et al:** Curr Top Microbiology *Inmmunology*, 2000: 251:3.
11. **Planas Ribó J.:** Criopreservación de las células madre provenientes del tejido graso obtenido mediante liposucción *Endochirurgia Estetica del Volto* 2011: 165.
12. **Butterwick KJ., Bevin AA., Iyer S.:** Fat Trasplation Using Fresh Versus Frozen Fat: A Side-by-Side Two-Hand Comparison Pilot Study. *Dermatologic Surg.* 2006, 32: 644.
13. **Cui XD., Gao DY., Fink BF., Vasconez HC., Pu LLQ.:** Cryopreservation of human adipose tissues. *Cryobiology* 2007, 55: 269.
14. **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.* 2009, 16(2).
15. **Zuk PA, Zhu M, Mizuno H et al.:** Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 2001, 7:211.