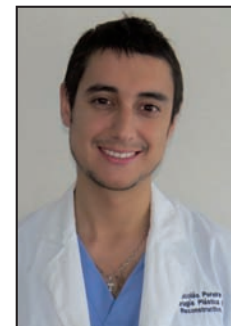


Criopreservación de células estromales derivadas del tejido adiposo: viabilidad utilizando un medio definido libre de proteína animal

Cryopreservation of adipose derived stromal cells: viability using a defined free of animal protein medium

Nicolás PEREIRA*, Esteban GONZÁLEZ**, Pablo CAVIEDES***



Pereira, N.

Resumen

Introducción y Objetivo. El tejido adiposo es una fuente de células estromales de fácil acceso. Para su almacenamiento y posterior aplicación en clínica es importante que el método de criopreservación a utilizar mantenga adecuadas tasas de viabilidad tras un ciclo de congelación.

El objetivo del presente trabajo es obtener células estromales humanas derivadas del tejido adiposo, implementar un protocolo de criopreservación libre de proteína animal y medir las tasas de viabilidad posterior a un ciclo de criopreservación para su eventual aplicación clínica.

Material y Método. Utilizamos grasa fresca de 5 pacientes sometidas a liposucción y aislamos las células estromales mediante técnicas de digestión enzimática y expansión celular. Realizamos la caracterización de las células mediante inmunofenotipificación. Criopreservamos las células utilizando dimetil-sulfóxido 10% y las almacenamos durante 1 mes en nitrógeno líquido. Evaluamos la tasa de viabilidad mediante ioduro de propidio y citometría de flujo, antes y después de un ciclo de criopreservación.

Resultados. Obtuvimos células estromales derivadas del tejido adiposo, confirmado con el panel de inmunofenotipificación. Las tasas de viabilidad promedio obtenidas con ioduro de propidio fue 61.89% mientras que la tasa de mortalidad fue 32.68% tras un ciclo de criopreservación.

Conclusiones. Mediante un protocolo de criopreservación utilizando un medio definido con dimetil-sulfóxido 10% en ausencia de proteína animal, es posible obtener tasas aceptables de viabilidad de las células estromales derivadas del tejido adiposo tras un ciclo de criopreservación.

Abstract

Background and Objective. Adipose tissue is an easy access source of stromal cells. For storage and subsequent clinical application, it is important that the method of cryopreservation used maintain adequate viability rates after a cycle of freezing.

Our aim is to get stromal cells derived from human adipose tissue, implement a protocol of cryopreservation free of animal protein and subsequent measure viability rates after a cryopreservation cycle for its posterior clinical use.

Methods. Fresh adipose tissue of 5 patients undergoing liposuction was used and stromal cells were isolated by enzymatic digestion techniques and cell expansion. Characterization of the cells was performed by immunophenotyping. Cells using 10% dimethylsulfoxide and stored for 1 month were cryopreserved in liquid nitrogen. Viability rates were assessed by propidium iodide and flow cytometry before and after a cryopreservation cycle.

Results. Stromal cells derived from adipose tissue, confirmed immunophenotyping panel, were obtained. The average viability rates obtained with propidium iodide was 61.89% while the mortality rate was 32.68% after a cryopreservation cycle.

Conclusions. Using a cryopreservation protocol with a defined medium with 10% dimethylsulfoxide and animal protein free, it is possible to obtain acceptable viability rates of stromal cells derived from adipose tissue after a cryopreservation cycle.

Palabras clave Tejido adiposo, Criopreservación, Células estromales derivadas del tejido adiposo, Células madre.

Nivel de evidencia científica 4d Terapéutico

Recibido (esta versión) 7 septiembre/2017

Aceptado 24 octubre/2017

Key words Adipose tissue, Cryopreservation, Adipose derived stromal cells, Stem cells.

Level of evidence 4d Therapeutic

Received (this version) 7 september/2017

Accepted 24 october/2017

Conflicto de intereses: los autores declaran no tener ningún interés financiero relacionado con el contenido de este artículo.

* Cirujano Plástico, Máster en Ciencias Biológicas y Médicas, Servicio de Cirugía Plástica y Quemados, Hospital del Trabajador, Departamento de Cirugía Plástica, Clínica Las Condes, Santiago, Chile.

** Cirujano General, Doctor en Ciencias Médicas.

*** Médico Cirujano, Doctor en Ciencias Biomédicas.

Laboratorio de Terapia Celular, Programa de Farmacología Molecular y Clínica, Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Santiago, Chile.



Introducción

La obesidad y el sobrepeso han aumentado de manera importante en los últimos años, lo que ha llevado a un incremento en los procedimientos quirúrgicos para disminuir la grasa corporal como son las abdominoplastías y lipoaspiraciones. Si bien el tejido adiposo rutinariamente se ha manejado como material de desecho, cirujanos plásticos y otros investigadores han documentado su uso como fuente abundante y accesible de células estromales multipotenciales utilizables en medicina regenerativa.⁽¹⁾ Dichas células se caracterizan por presentar marcadores estromales positivos (>90%) como CD13, CD73 y CD90; y marcadores hematopoyéticos negativos (<2%) como CD11b y CD45.⁽²⁾ Diversos estudios han demostrado que estas mantienen su capacidad de diferenciación en múltiples tipos celulares incluyendo osteoblastos, condrocitos, adipocitos, miocitos y neuronas, tras una expansión *in vitro*.^(1,3-5)

Dado que el tejido adiposo permite extracciones de grandes volúmenes con baja morbilidad este tejido se presenta actualmente como una interesante fuente de obtención de células estromales, de fácil acceso y con volúmenes de tejido considerables.

Las células estromales derivadas del tejido adiposo (CEDA) han probado ser candidatas adecuadas para muchas aplicaciones en medicina regenerativa e ingeniería de tejidos,⁽⁵⁾ tales como defectos y trastornos óseos, enfermedades cardiovasculares, trastornos neurológicos, enfermedades autoinmunes, así como para mejorar el resultado del trasplante de médula ósea y de órganos sólidos.^(6,7)

Un tema que surge respecto al almacenamiento y la preservación de estas células para la posterior aplicación en clínica, es el método de criopreservación a utilizar que logre mantener adecuadas tasas de viabilidad y preservar el potencial de diferenciación de las CEDA tras un ciclo de congelación.⁽⁸⁾ La comprensión de las características biológicas durante el almacenamiento y postdescongelación de estas células es esencial en la investigación preclínica y clínica para asegurar la preservación de sus propiedades.⁽⁹⁾ Por lo tanto, el desarrollo de protocolos efectivos de almacenamiento de CEDA aumentará su uso y utilidad en la aplicación en ingeniería de tejidos.

La criopreservación requiere la utilización de productos químicos que cumplan con la función de ser agentes crioprotectores (CP), equipamiento de congelación y obviamente, su almacenaje en nitrógeno líquido.

El daño producido por la criopreservación típicamente se debe a:⁽¹⁰⁻¹³⁾

- Injurias osmóticas o tóxicas debido a la adición de CP que son necesarios para disminuir el daño por congelación.
- Injurias por enfriamiento asociado a la disminución de la temperatura desde la ambiental a la de cambio de fase (formación de hielo).
- Injurias por congelación asociada con la formación de hielo extra e intracelular.

- Daño por descongelación asociado al aumento de la temperatura desde su almacenamiento en nitrógeno líquido a la temperatura ambiental.

No obstante todo lo anterior, la criopreservación ha mostrado ser el protocolo más eficiente en cuanto a recuperación de células viables postalmacenamiento y es ampliamente utilizada. El medio ideal para criopreservar CEDA es aquel que reúna condiciones de atoxicidad y que logre una mayor viabilidad celular sin disminuir el potencial de diferenciación. Es así como la elección y la composición de un medio óptimo de criopreservación es un área de intensa investigación en el campo de la criobiología.

Nuestra línea de trabajo está dirigida hacia la aplicación clínica de las CEDA para medicina regenerativa. Para esto se deben generar protocolos que optimicen la tasa de viabilidad postcriopreservación sin necesidad de utilizar criopreservantes que contengan proteína animal. El dimetilsulfóxido (DMSO) es uno de los CP más utilizados y de mejor rendimiento en cuanto a tasa de viabilidad postcriopreservación.⁽¹⁴⁾

El objetivo de nuestro trabajo es obtener células estromales humanas derivadas del tejido adiposo, implementar un protocolo de criopreservación que utilice un medio definido libre de proteína animal y medir las tasas de viabilidad de CEDA tras un ciclo de criopreservación para su eventual aplicación clínica.

Material y método

Pacientes y muestra

Utilizamos grasa fresca de tejido celular subcutáneo de la pared abdominal de 5 pacientes sometidas a lipoaspiración electiva en el Hospital Clínico de la Universidad de Chile. Empleamos como criterios de inclusión: pacientes de sexo femenino, de entre 20 a 45 años de edad, con índice de masa corporal (IMC) inferior a 28 kg/m² y sin comorbilidades asociadas. Obtuvimos la autorización de cada paciente mediante un consentimiento informado escrito específico para la investigación y aprobado por el Comité de Ética Científico de la misma institución.

Obtención de las células estromales derivadas del tejido adiposo

Procesamos las muestras dentro de las primeras 6 horas tras su extracción de las pacientes. Utilizamos 100 ml de grasa fresca que lavamos 3 veces con 100 ml de una solución tampón fosfato (PBS - *Phosphate-Buffered Saline*) a temperatura ambiente para remover eritrocitos y leucocitos. Rescatamos el tejido adiposo sobrenadante y lo resuspendimos en un volumen equivalente de medio DMEM/F12 (*Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12*, Gibco®, EE.UU.) con colagenasa tipo I al 0.1% (Gibco®, EE.UU.). Incubamos la solución en un baño a 37 °C, con agitación continua durante 90 minutos. Luego la centrifugamos a 600 G durante 20 minutos a temperatura ambiente para separar los adipocitos

maduros de la fracción vascular estromal (FVE). Aspiramos el sobrenadante quedando el *pellet*, que corresponde a la FVE que contiene las CEDA. La FVE fue resuspendida en el medio de cultivo y sembrada en placas de cultivo de 100 mm de diámetro para expansión celular.

Las células fueron expandidas realizando subcultivos (1:2) cuando se alcanzaba el 80% de confluencia.

Caracterización de las células estromales derivadas del tejido adiposo

Realizamos un panel de inmunofenotipificación mediante citometría de flujo en 3 muestras de CEDA de nuestro laboratorio en el subcultivo número 3. Consideramos 20.000 eventos por marcador como control de calidad correspondiente a la utilización de estas células.^(2,15)

Proceso de criopreservación

La criopreservación la llevamos a cabo entre los subcultivos 3-4 (dentro de la fase exponencial de crecimiento). Una vez alcanzada la cantidad celular necesaria (4.5 a 5 millones de células, aproximadamente), se liberaron las células de la misma forma que para un subcultivo. Luego realizamos recuentos con *Trypan Blue* en cámara de Neubauer, rescatando una muestra de 0.5×10^6 cél/ml para criopreservarla en un medio vehículo (DMEM/F12 con rojo fenol, Gibco®, EE.UU.) con DMSO 10% (1.5 M). Realizamos el control con medio vehículo sin CP.

Empleamos una técnica de baja complejidad y costo-efectiva para llevar los criotubos a -80 °C de manera semicontrolada. Para este fin, utilizamos un receptáculo con isopropil alcohol que produce disminución de la temperatura a una velocidad aproximada de 1 °C/min (Thermo Scientific Nalgene Mr. Frosty®, Misuri, EE.UU.)^(16,17) Al día siguiente, los criotubos se cambiaron a nitrógeno líquido para ser almacenados hasta su utilización. A las 4 semanas los descongelamos en un baño a 37 °C (1 minuto) y evaluamos la viabilidad.

Evaluación de la viabilidad

Determinamos la viabilidad de las CEDA con citometría de flujo cuantitativa antes y después de un ciclo de criopreservación. Para esto cargamos 3 tubos para citometría con 200 µL de suspensión celular (0.5×10^6 cél/ml) por paciente. Como controles utilizamos células necróticas inducidas por metanol⁽¹⁴⁾ (1 tubo) y células vivas no criopreservadas (1 tubo). Empleamos el marcador yoduro de propidio (IP) mezclando la suspensión celular con 2 µL de IP antes de la adquisición de datos por el citómetro. La tinción celular con IP indica que se ha alterado la integridad de la membrana plasmática, por lo que su marcación con el colorante indica que las células se encuentran necróticas, distinguiéndose así de las células vivas. La citometría, por lo tanto, mostrará 2 poblaciones celulares: vivas (IP-negativas) y necróticas (IP-positivas). Analizamos las células mediante un sistema de

citometría de flujo Becton-Dickinson® (Nueva Jersey, EE.UU.), considerando 40.000 eventos como significativos.

Calculamos la tasa de viabilidad obtenida mediante citometría de flujo con IP a través de la siguiente fórmula:

$$\text{Tasa viabilidad (\%)} = \frac{\text{Viabilidad postcriopreservación} \times 100}{\text{Viabilidad precriopreservación}}$$

RESULTADOS

Para la obtención del aspirado de grasa incluimos en el estudio 5 pacientes de sexo femenino, con una edad de 38 años (rango de 28 a 34 años), IMC de 26.6 kg/m² (rango de 25.2 a 27.8 kg/m²) y la grasa extraída fue 1950 ml (rango de 1700 a 2200 ml) (Tabla I).

Obtuvimos células estromales derivadas del tejido adiposo lipoaspirado de estas 5 pacientes. El panel de inmunofenotipificación fue compatible con CEDA (Tabla II: en la columna de la derecha mostramos los criterios IFATS-ISCT⁽²⁾ para ser consideradas células estromales derivadas del tejido adiposo, y en las columnas de la izquierda los hallazgos obtenidos que son compatibles con dichos criterios).

Medimos la viabilidad de las CEDA de cada paciente mediante citometría de flujo con yoduro de propidio (IP). En la Fig. 1 vemos los histogramas obtenidos del control negativo (células necróticas), control positivo (células vivas), precriopreservación y postcriopreservación. Realizamos los controles negativo y positivo para evaluar la capacidad de la citometría de flujo de detectar células muertas y vivas, respectivamente. En las figuras inferiores observamos la viabilidad antes y después de un ciclo de criopreservación y cómo se distribuye la cantidad de células vivas y muertas en el histograma.

La tasa de viabilidad promedio obtenida de los diferentes pacientes fue 61.89% (rango de 48.81 a 78.41%), mientras que la tasa de mortalidad promedio fue de 32.68% (rango de 18.38 a 43.49%). Presentamos el detalle de las tasas de viabilidad y mortalidad de las 5 pacientes en las Fig. 2 y 3, respectivamente.

Tabla I. Características de las pacientes estudiadas

| | Promedio | Rango |
|--------------------------|----------|-------------|
| Edad (años) | 38 | 28 - 44 |
| IMC (kg/m ²) | 26.6 | 25.2 - 27.8 |
| Grasa extraída (ml) | 1950 | 1700 - 2200 |
| Grasa procesada (ml) | 100 | |

IMC: índice de masa corporal

Tabla II. Panel de inmunofenotipificación de 3 muestras de células estromales derivadas del tejido adiposo

| Marcador | 1 | 2 | 3 | Criterio IFATS-ISCT |
|-------------|------|------|------|---------------------|
| IgG1k- FITC | 3.76 | 1.1 | 2.58 | ND |
| IgG1k- PE | 3.83 | 1.63 | 2.46 | ND |
| IgG1k-AF488 | 3.42 | 0.14 | 0.86 | ND |
| IgG2bk-PE | 3.24 | 0.43 | 0.83 | ND |
| CD29-PE | 99.8 | 100 | 100 | >80% Positivo |
| CD44-FITC | 98.7 | 93.4 | 99.6 | >80% Positivo |
| CD73-PE | 99 | 99.8 | 99.9 | >80% Positivo |
| CD90-FITC | 99.5 | 97 | 99.7 | >80% Positivo |
| CD105-PE | 99.2 | 99.7 | 99.6 | >80% Positivo |
| CD34-PE | 22.7 | 14.5 | 4.88 | 2-30% Variable |
| CD45-FITC | 3.73 | 0.12 | 2.61 | <2% |
| CD19-FITC | 3.6 | 1.21 | 2.86 | Bajo o negativo |
| CD11b-AF488 | 3.32 | 0.38 | 2.31 | Bajo o negativo |
| HLADR-PE | 2.92 | 3.77 | 2.35 | Bajo o negativo |

IFATS: International Federation for Adipose Therapeutics and Science; ISCT: International Society for Cellular Therapy; ND: no detectable

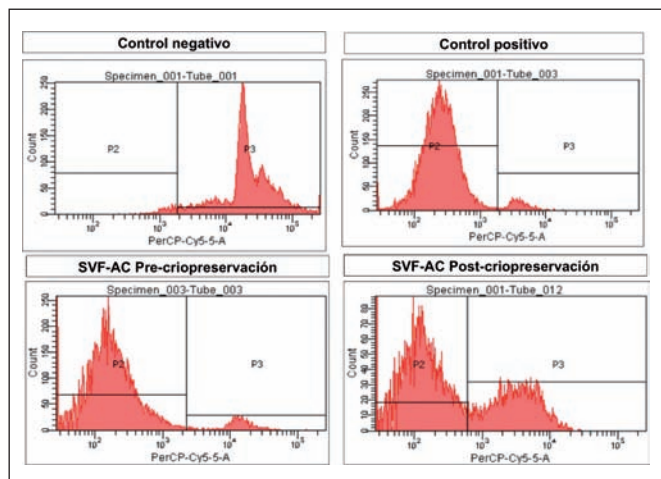


Fig. 1. Ejemplo de histogramas obtenidos: células de control negativo (metanol), control positivo (células vivas), antes del ciclo de criopreservación y posterior a este (SVF-AC: células estromales derivadas del tejido adiposo).

Discusión

En nuestra experiencia, es posible obtener tasas de viabilidad aceptables de células estromales derivadas del tejido adiposo tras un ciclo de criopreservación utilizando DMSO 10% en ausencia de proteína animal.

El uso de productos químicos en el medio de congelación, que partió como una observación fortuita de

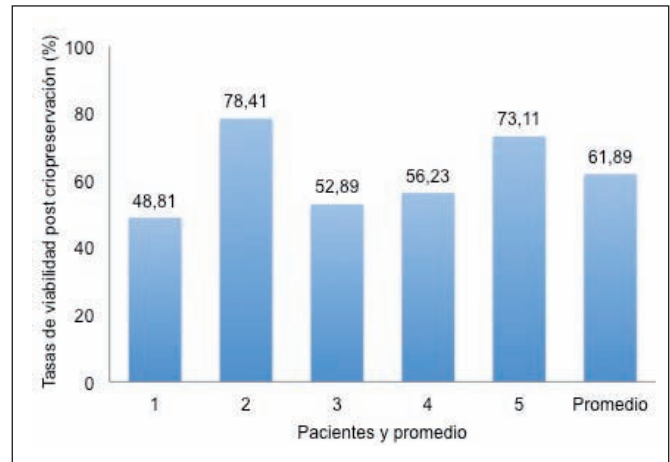


Fig. 2. Tasas de viabilidad de las CEDA postcriopreservación (%) obtenidas mediante PI por citometría de flujo de las 5 pacientes y el promedio.

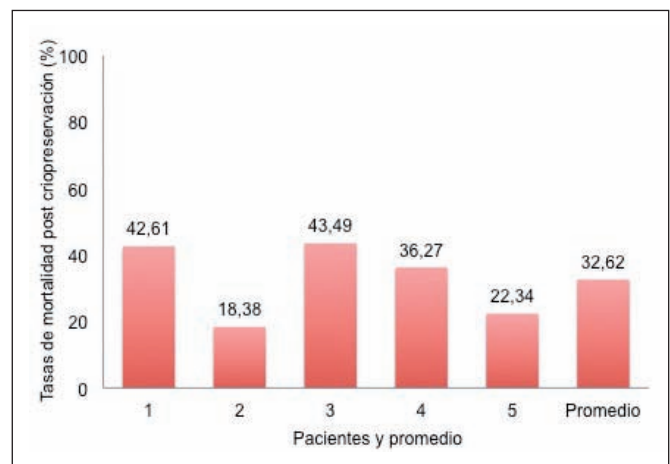


Fig. 3. Tasas de mortalidad de las CEDA postcriopreservación (%) obtenidas mediante PI por citometría de flujo de las 5 pacientes y el promedio.

Polge⁽¹³⁾ en los años 40, ha mostrado hoy en día ser un requisito para el resultado exitoso de un proceso de criopreservación.

El medio ideal para criopreservar CEDA es aquel que no sea tóxico y que logre una mayor viabilidad celular sin disminuir el potencial de diferenciación. Thirumala y col.⁽¹⁴⁾ demostraron que se puede lograr una viabilidad de hasta un 87% con un medio de congelación libre de suero (humano o bovino) utilizando DMSO 10%. Esta viabilidad es mayor que la obtenida con menores concentraciones de DMSO (2, 4, 6 y 8%) cuando se combinaba con metilcelulosa o con suero fetal bovino o humano. En otro trabajo, este mismo autor mostró similares resultados de viabilidad en medios que utilizaban DMSO comparados con PVP 10% (63 frente a 54).⁽¹⁸⁾ Esto coincide con estudios que demuestran que existe una factibilidad técnica y que la morfología e integridad de membrana son comparables en medios de criopreservación libres de suero humano y heterólogos utilizando sólo DMSO como criopreservante, tanto en CEDA como en otras células progenitoras humana.⁽¹⁹⁾ En nuestro trabajo obtuvimos tasas de viabilidad menores, pero sin embargo aceptables y comparable a las de algunos estudios previos utilizando

un medio definido, libre de proteína animal, que lo hace reproducible y permite su eventual aplicación en clínica.

La menor tasa de viabilidad obtenida en nuestro estudio tras 4 semanas de criopreservación no puede ser explicada por el tiempo en que se almacenaron las CEDA en nitrógeno líquido (aproximadamente -196°C). Se ha observado que estas células mantienen tasas de viabilidad $>80\%$ tras 1 y 6 meses, cayendo sólo al 70% al año de criopreservación;⁽²⁰⁾ sin embargo, mantienen su capacidad de diferenciación y el fenotipo de los marcadores de superficie. Otro factor que podría haber influido en nuestras tasas de viabilidad postcriopreservación obtenidas es la velocidad a la cual son congeladas las células. La velocidad controlada ($1^{\circ}\text{C}/\text{min}$) tiene mejores resultados en la criopreservación de células mamíferas.⁽²¹⁾ El descenso controlado de la temperatura permite que se forme hielo extracelular mientras el agua *supercooled*, proceso mediante el cual se disminuye la temperatura de un líquido o gas bajo su punto de congelación sin llevarlo a estado sólido, se transporta fuera de la célula, logrando así la vitrificación del medio intracelular. A velocidades más lentas se genera daño producto de un aumento de la concentración de solutos intracelulares a medida que el agua sale de la célula llegando a la deshidratación. Por el contrario, a velocidades más rápidas el agua no alcanza a salir de la célula y se genera hielo intracelular que produce la ruptura de la membrana.⁽²¹⁾ La utilización de un sistema semicontrolado o no automático podría exponer a las células a velocidades mayores o menores a la ideal durante el proceso de congelación, provocando una disminución en las tasas de viabilidad en comparación con sistemas automatizados de disminución de la temperatura.

Si bien nuestro rendimiento en cuanto a viabilidad postcriopreservación es inferior al reportado por otros autores,^(14,22) la evaluación de esas tasas habitualmente se realiza mediante una técnica poco precisa como es la exclusión con *Trypan Blue*.^(23,24) Está descrito que esta técnica tiende a sobreestimar la viabilidad, por ejemplo: un 90% de células descongeladas se excluyen con esta prueba (viables), sin embargo sólo un 60% de muestra ser capaz de adherirse a la placa a las 24 horas, condición fundamental de las CEDA.⁽²³⁾ La medición de la viabilidad utilizando una técnica más precisa como IP por citometría de flujo, es una estrategia más adecuada para enfrentar esta interrogante ya que evalúa la viabilidad mediante la valoración de la integridad de la membrana plasmática y nuclear. Es así como el IP evalúa la etapa final de la muerte celular,⁽²⁵⁾ por lo que las células inviables no impactan en la mortalidad.

El desafío ahora para nuestro laboratorio es intentar esclarecer las variables que podrían haber influido en las tasas de viabilidad obtenidas mediante estudios de criopreservación con un sistema de descenso automatizado de la temperatura o a través de la utilización de diferentes combinaciones de CP. Además sería interesante co-

nocer las características de las células descongeladas en cuanto a su capacidad de adherirse y expandirse en la placa, formar colonias y diferenciarse en diferentes tipos celulares.

Conclusiones

Las células estromales derivadas del tejido adiposo han probado ser candidatas adecuadas para muchas aplicaciones en medicina regenerativa. El almacenamiento mediante criopreservación de estas células para su posterior utilización clínica aumentará su uso y aplicación en ingeniería de tejidos.

Mediante un protocolo de criopreservación que utilice DMSO 10% en ausencia de proteína animal, es posible obtener tasas de viabilidad aceptables de células estromales derivadas del tejido adiposo tras un ciclo de criopreservación. Al utilizar un medio definido, el procedimiento es reproducible y permite su eventual aplicación en clínica.

Dirección del autor

Dr. Nicolás Pereira
Estoril 450, 4° piso Edificio Azul.
Departamento de Cirugía Plástica
Las Condes, Santiago, Chile #7591047
Correo electrónico: npereira@clc.cl

Bibliografía

1. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, et al. Human adipose tissue is a source of multi-potent stem cells. *Mol Biol Cell*. 2002; 13:4279-4295.
2. Bourin P, Bunnell BA, Casteilla L, et al. Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics (IFATS) and Science and the International Society for Cellular Therapy (ISCT). *Cytotherapy*, 2013; 15:641-648.
3. Gimble JM, Katz AJ, Bunnell BA. Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circ Res*. 2007; 100:1249-1260.
4. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng*. 2001; 7:211-228.
5. Guilak F, Lott KE, Awad HA et al. Clonal analysis of the differentiation potential of human adipose-derived adult stem cells. *J Cell Physiol*. 2006; 206:229-237.
6. Nathan S, Das De S, Thambyah A, et al. Cell-based therapy in the repair of osteochondral defects: a novel use for adipose tissue. *Tissue Eng*. 2003; 9:733-744.
7. Schäffler A, Büchler C. Concise review: adipose tissue-derived stromal cells-basic and clinical implications for novel cell-based therapies. *Stem Cells*. 2007; 25:818-827.
8. Yong KW, Pinguan-Murphy B, Xu F, et al. Phenotypic and Functional Characterization of Long-Term Cryopreserved Human Adipose-derived Stem Cells. *Sci Rep*. 2015; 5:9596:1-10.
9. Devireddy RV, Thirumala S, Gimble JM. Cellular response of adipose derived passage-4 adult stem cells to freezing stress. *J Biomech Eng*. 2005; 127:1081-1086.
10. Pegg DE. Mechanisms of freezing damage. *Symp Soc Exp Biol*. 1987; 41:363-378.

11. **Pegg DE.** Principles of cryopreservation. *Methods Mol Biol.* 2007; 368:39-57.
12. **Bischof JC, Rubinsky B.** Large ice crystals in the nucleus of rapidly frozen liver cells. *Cryobiology.* 1993; 30:597-603.
13. **Venkatasubramanian RT, Grassl ED, Barocas VH, et al.** Effects of freezing and cryopreservation on the mechanical properties of arteries. *Ann Biomed Eng.* 2006; 34:823-832.
14. **Thirumala S, Gimble JM, Devireddy RV.** Evaluation of methylcellulose and dimethylsulfoxide as the cryoprotectants in a serum-free freezing media for cryopreservation of adipose-derived adult stem cells. *Stem Cells Dev.* 2010; 19:513-522.
15. **Yoshimura, K, Shigeura, T, Matsumoto, D, et al.** Characterization of freshly isolated and cultured cells derived from the fatty and fluid portions of liposuction aspirates. *J. Cell. Physiol.* 2006; 208:64-76.
16. **Laboratory Technologists Committee of the adult AIDS Clinical Trials Group.** Consensus protocol for PBMC cryopreservation and thawing (Version 3.0). 1-8, 2002. <http://www.cryocatalog.ru/info/freezingprotocol.pdf>
17. **Simione FP.** Thermo Scientific Nalgene and Nunc Cryopreservation Guide. 2009. https://www.atcc.org/~media/PDFs/Cryopreservation_Technical_Manual.ashx
18. **Thirumala S, Gimble JM, Devireddy RV.** Cryopreservation of stromal vascular fraction of adipose tissue in a serum-free freezing medium. *J Tissue Eng Regen Med.* 2010; 4:224-232.
19. **Zeisberger SM, Schulz JC, Mairhofer M, et al.** Biological and physicochemical characterization of a serum and xeno-free chemically defined cryopreservation procedure for adult human progenitor cells. *Cell Transplant.* 2011; 20:1241-1257.
20. **De Rosa A, De Francesco F, Tirino V, et al.** A new method for cryopreserving adipose-derived stem cells: an attractive and suitable large-scale and long-term cell banking technology. *Tissue Eng Part C Methods.* 2009; 15:659-667.
21. **Shu Z, Gao D, Pu LL.** Update on Cryopreservation of Adipose Tissue and Adipose-derived Stem Cells. *Clin Plast Surg.* 2015; 42:209-218.
22. **Gimble JM, Bunnell BA.** Adipose-derived stem cells. En: Methods for the purification and characterization of human adipose-derived stem cells. United Kingdom. Springer, 2011. Pp.109-120.
23. **Miyamoto Y, Oishi K, Yukawa H, et al.** Cryopreservation of human adipose tissue-derived stem/progenitor cells using the silk proteins ericin. *Cell Transplant.* 2012; 21:617-622.
24. **Zhang P, Policha A, Tulenko T, et al.** Autologous human plasma in stem cell culture and cryopreservation in the creation of a tissue-engineered vascular graft. *J Vasc Surg.* 2014; S0741-5214(14)01897-7.
25. **Pereira N, González E, Caviedes P.** Criopreservación de células estromales derivadas del tejido adiposo: Comparación de diferentes medios de criopreservación. *Rev. Chil. Cir.* 2016; 68:295-301.