

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BILOGÍA



**Aislamiento, cultivo y caracterización de células madre
mesenquimales provenientes de tejido adiposo humano**

Trabajo Especial de Grado :

Presentado ante la ilustre Universidad Central de Venezuela por la bachiller Andreina Gabriela Sánchez González como requisito parcial para optar al título de Licenciado en biología

Tutores:

Dra. María Elena Márquez (IVIC)

Dra. Ana Gómez

CARACAS, VENEZUELA, MAYO DE 2014.

RESUMEN

Actualmente la investigación sobre las células madre ha incrementado por sus posibles aplicaciones clínicas en la terapia celular regenerativa, la cual se basa en la capacidad de las células madre de autorenovarse y diferenciarse a líneas celulares que forman parte de los tejidos en el organismo. De acuerdo a su localización encontramos dos tipos de células madre: las embrionarias y las adultas que mayormente comprenden a las hematopoyéticas y las mesenquimales. Recientemente, la terapia celular de regeneración de tejidos que estudia la posible utilización de las células madre mesenquimales (CMM) en diversas patologías, ha cobrado gran interés. Estas células pueden ser aisladas principalmente de diferentes tejidos como: médula ósea, tejido amniótico, pulpa dental, sangre de cordón umbilical, tejidos fetales, placenta y tejido adiposo, a partir de los cuales se han logrado establecer cultivos que han permitido estudiar sus propiedades funcionales y características. El tejido adiposo ha sido estudiado como fuente alternativa por su fácil acceso, pocas limitaciones éticas, y la presencia de una alta proporción de CMM. Por este motivo nos propusimos en este trabajo estandarizar una metodología para la obtención de CMM de tejido adiposo y estudiar su potencial de diferenciación mediante la realización de ensayos “*in vitro*” con fines de posibles aplicaciones en la terapia celular regenerativa. Para ello se tomó muestra de tejido adiposo a cuatro pacientes que se realizaron un procedimiento de liposucción. Estas muestras fueron digeridas exitosamente con Colagenasa I durante una hora, y luego de obtener la fracción vascular estromal se procedió al aislamiento y cultivo de las CMM. Las células obtenidas cumplieron todos los criterios establecidos por la ISCT que definen una CMM: 1) Adherencia al plástico mostrando morfología fibroblastoide a las 72 horas; 2) Alta expresión (>95%) en su membrana de las moléculas CD90, CD73, CD105 y ausencia de las moléculas HLA-DR, CD34, CD45 y CD14 (<2%), a partir del segundo pasaje de cultivo. 3) Capacidad de diferenciación *in vitro* hacia osteoblastos, adipoblastos y condroblastos, desde las dos semanas de cultivo en medios de diferenciación específicos, demostrado por tinciones diferenciales. Los resultados de este proyecto corroboran las ventajas de la obtención de CMM a partir de tejido graso, y su factible utilización en procedimientos de terapia celular para regeneración de tejidos.

Dedicatoria

Este trabajo lo dedico a mis papas,
que siempre han representado mi pilar
y mi guía para todo en esta vida...

Agradecimientos

Agradezco primeramente a Dios, por escuchar mis oraciones y plegarias en todos los momentos de tensión y penurias; doy gracias a mi familia y amigos, a mis abuelos Bertha y Gilberto que siempre están conmigo y disfruto de su compañía y la música, a mis padres Marisol y Manuel que siempre estuvieron conmigo en la realización de una de mis metas apoyándome constantemente pese a las dificultades.

Agradezco al IVIC (Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas) por permitirme estar en sus instalaciones y laboratorios para realizar mi tesis, doy las gracias por encontrar un equipo humano tan maravilloso como el de Laboratorio de Patología de Molecular y Celular que me permitieron sentirme a gusto y muchas veces ayudarme en esas situaciones incómodas, especialmente a la Dra. Ingrid Silva, más que una colega, una amiga, que me enseñó muchísimo y me sirvió de ejemplo, a mi tutora, la Dra. Maria Elena Márquez que me soporto con una enorme paciencia, me ayudó en los momentos difíciles y me guió en medio de la tesis para todos sus pasos correspondientes.

Muchísimas gracias a la Profe. Ana Gómez que con su guía y apoyo, me dio luz en mi elaboración del trabajo, gracias por la comprensión y los consejos que más que solo por un trabajo valen para toda una vida.

A la Profe. Valentina Salas, que desde el segundo semestre me dijo “pichón de bióloga” y para mí significó muchísimo tenerla como un ejemplo a seguir,

siempre aconsejándome cuando más lo necesite, entregándome su tiempo y dedicación para ser una mejor estudiante y presentar un trabajo de mejor calidad.

A la Profe. Elizabeth Merentes que siempre me guió en una de mis materias favoritas de toda la carrera, me ofreció su apoyo y consejo siempre, con sus revisiones tan dedicadas y explicándome tan detalladas con tanta paciencia para mí.

Agradezco a mis amigos, los de toda la vida, quienes siempre me brindaron su apoyo incondicional aunque ya no jugara/tocara con ellos por falta de tiempo, gracias a Felix, Christian, Samir, José y Adri.

A la facultad de Ciencias, porque me enseñó a pensar, razonar y sobre todo a la Escuela de Biología, que me brindó las herramientas y el adiestramiento necesario para hacer ciencia, forjándome como la profesional que aspiro ser.

LISTA DE ABREVIATURAS

α MEM: del inglés, “*minimum essential medium*”, se traduce como medio mínimo esencial de eagle

ASC: del inglés “*adipose stem cells*”, se traduce como células madre mesenquimales provenientes del tejido adiposo

CD: de inglés “*cluster of differentiation*”, significa moléculas de superficie. Mayormente va acompañado de un número que indica su especificidad.

CMM: Células madre mesenquimales

CMM-MO: Células madre mesenquimales de médula ósea

CMM-TA: Células madre troncales multipotentes provenientes de tejido adiposo

CMH: Células madre hematopoyéticas

DMSO: Dimetil sulfóxido

EDTA: Ácido Etilendiaminotetraacético.

FVS: del inglés, *stromal vascular fraction*, que significa, Fracción vascular estromal

GPI: del inglés, “*glycosylphosphatidyl inositol I*” que significa glicofosfatidilinositol I

HLA-DR: antígeno leucocitario humano (del inglés de *Human leukocyte antigen*).

IBMX: 3-Isobutil-1-methylxanthina

ISCT: del inglés *Internacional Society Cellular Therapy*, la sociedad internacional de terapia celular

LBP: del inglés “*Lipopolysaccharide – binding protein*” que se traduce proteína lipopolisacarida

MHC-II: del inglés *major histocompatibility complex type II*, que se traduce como complejo de mayor histocompatibilidad de clase II

PBS: Buffer salino fosfato

PFA: Paraformaldehido

PRP: plasma rico en plaquetas

TGF β 1: factor de crecimiento transformante beta I

SFB: Suero Fetal Bovino.

ÍNDICE DE CONTENIDOS	PÀGINA
1. Introducción.....	12
1.1. Células Madre, definición y su clasificación.....	15
Definición	15
Tipos de células madre	16
<i>Clasificación según su potencialidad</i>	16
<i>Clasificación según su origen</i>	16
• Células madre embrionarias.....	17
• Células madre adultas.....	17
Células madre hematopoyéticas	17
Células madre mesenquimales	19
1.2. Fuentes de obtención de células madre.....	22
1.3. Historia de la terminología de las células madre mesenquimales del tejido adiposo.....	23
1.4. Caracterización de células madre mesenquimales de tejido adiposo.....	26
Adherencia al plástico	26
Expresión de marcadores de membrana celular para la identificación de células madre mesenquimales del tejido adiposo	27
<i>Marcadores con expresión positiva</i>	27

<i>Marcadores con expresión negativa</i>	28
1.5. Diferenciación de las células madre mesenquimales del tejido adiposo.....	29
1.6. Propiedades Inmunomoduladoras de las células madre mesenquimales del tejido adiposo.....	31
1.7. Tejido Adiposo.....	35
Origen y desarrollo en el humano	35
Tipos de tejido adiposo	36
1.8. Aplicaciones clínicas de las células madre.....	39
2. Antecedentes de la investigación.....	42
3. Justificación.....	46
4. Objetivos.....	49
Objetivo General	49
Objetivos específicos	49
5. Materiales y Métodos.....	50
5.1. Reactivos	50
5.2. Pacientes.	50
Bioética	50
<i>. Criterios de inclusión y exclusión de los pacientes</i>	51

5.3. Aislamiento y cultivo de células madre mesenquimales del tejido adiposo	51
Operación y Traslado al laboratorio	51
Procedimiento para el aislamiento de células madre mesenquimales	52
Cultivo primario de células madre mesenquimales	54
<i>Mantenimiento del cultivo y tripsinización</i>	54
<i>Contaje y viabilidad de las células madre mesenquimales de tejido adiposo</i>	55
5.4. Congelamiento de las células.....	56
5.5. Inmunofenotipo de células madre mesenquimales mediado por citometría de flujo.....	57
5.6. Cultivo de células madre mesenquimales de tejido adiposo para diferenciación <i>in vitro</i>	58
Cultivo de células madre mesenquimales en medio de inducción osteogénico	59
Cultivo de células madre mesenquimales en medio de inducción condrogénico	60
Cultivo de células madre mesenquimales en medio de inducción adipogénico	60
Fijación de células CMM-TA inducidas hacia linajes osteogénicos, condrogénicos y adipogénicos	61

5.7. Identificación de inducción hacia linajes Condrogénico, Osteogénico y adipogénico por medio de las tinciones celulares <i>Alcian Blue, Alizarin Red y Oil Red</i>	61
6. Resultados.....	64
6.1. Aislamiento de células madre mesenquimales a partir de tejido adiposo de pacientes sometidos a liposucción	65
Distribución de los pacientes	66
Estandarización en el aislamiento de células madre mesenquimales de tejido adiposo	68
6.2. Identificación de los marcadores de superficie expresados en las células madre mesenquimales de tejido adiposo.....	73
6.3. Inducir diferenciación <i>in vitro</i> de las células madre mesenquimales de tejido adiposo hacia células osteogénicas, adipogénicas y condrogénicas.....	77
7. Discusión.....	87
8. Conclusiones.....	93
9. Recomendaciones.....	96
10. Referencias Bibliográficas.....	98
11. Anexos	104
12. Apéndices	106
13. Estudio previo de las recomendaciones realizadas.....	114

ÍNDICE DE FIGURAS

PÀGINA

Figura 1. Modelo jerárquico de las células madre de acuerdo a su origen.....	21
Figura 2. Fuentes de obtención de CMM en tejidos adultos.....	23
Figura 3. Efectos inmunomoduladores de CMM en diferentes células del sistema inmune.....	34
Figura 4. Secuencia de diferenciación del adipocito.....	38
Figura 5. Relación entre la cantidad de células totales obtenidas por masa de la muestra de grasa procesada.....	67
Figura 6. Comparación del cultivo primario de las células madre mesenquimales del tejido adiposo a las diferentes horas luego del aislamiento por digestión enzimática.....	69
Figura 7. Cambios en la morfología y confluencia del cultivo de células madre mesenquimales provenientes del tejido adiposo dependientes del tiempo.....	61
Figura 8. Comparación morfológica a las 72 horas de cultivo de las células madre mesenquimales provenientes del tejido adiposo entre células refrigeradas a 4 °C por 24 horas y las células procesadas el mismo día.....	72
Figura 9. Comparación del inmunofenotipo de las células madre mesenquimales en el transcurso del cultivo.....	74

Figura 10. Análisis representativo en forma de histogramas en una citometría de flujo realizada sobre las CMM-TA.....	76
Figura 11. Diferenciación Adipogénica “ <i>in vitro</i> ” de las muestras procesadas.....	79
Figura 12. Diferenciación Osteogénica “ <i>in vitro</i> ” de las muestras procesadas.....	82
Figura 13. Diferenciación Osteogénica “ <i>in vitro</i> ” de las muestra 4.....	83
Figura 14. Diferenciación Condrogénica “ <i>in vitro</i> ” de las muestras procesadas....	85

ÍNDICE DE TABLAS

PÀGINA

Tabla 1. Algunas moléculas expresadas en la superficie celular utilizadas en conjunto para la caracterización de las CMM-TA.....	27
Tabla 2. Posibles diferenciaciones de CMM-TA hacia tres linajes mesenquimales señalando los distintos suplementos añadidos al medio de cultivo de diferenciación “ <i>in vitro</i> ”.....	58
Tabla 3. Distribución de los pacientes según sexo y cantidad de muestra en gramo.....	65
Tabla 4. Resumen de las muestras procesadas y cantidad de células totales obtenidas.....	66
Tabla 5. Distribución general de la inducción a diferenciación “ <i>in vitro</i> ” hacia linajes osteogénicos, adipogénicos y condrogénicos.....	78

1. INTRODUCCIÓN

Las células madre tienen la capacidad de generar todo tipo de célula que conforman un organismo, basando en esta característica, la medicina regenerativa ve como una alternativa el tratamiento con células madre en la terapia celular, donde se reparen tejidos y órganos de una manera similar a como lo haría el organismo para el mantenimiento y renovación de las poblaciones dañadas o envejecidas. Entre los tipos de células madre, se encuentran, las células madre troncales mesenquimales (CMM) que son células multipotentes y adultas con morfología fibroblastoide y plasticidad hacia diversos linajes celulares como condrocitos, osteocitos y adipocitos, entre otros. Estas células pueden ser aisladas principalmente de médula ósea, sangre de cordón umbilical, tejido gingival, sangre periférica y tejido adiposo donde se han logrado establecer cultivos que han permitido estudiar sus propiedades funcionales y fenotípicas. Aunque la información obtenida hasta la fecha no brinda un conocimiento completo, se espera que con el desarrollo de las próximas investigaciones se aclaren diversos aspectos biológicos para implementar su uso en aplicaciones clínicas. (Verfaillie, 2002)

Desde el año 2006, la Sociedad Internacional de Terapia Celular ó ISCT (del inglés, *International Society Cellular Therapy*) propuso tres criterios para definir CMM; primero, éstas células deben ser adherentes al plástico en cultivo; segundo, expresar los antígenos CD73, CD90 y CD105 en ausencia de antígenos hematopoyéticos como CD34, CD45, CD11b, CD14; y tercero, las CMM deben ser

capaces de diferenciarse *in vitro* en osteoblastos, adipocitos y condrocitos bajo condiciones estándar (incubación a 37°C, 5% de CO₂ y pH de 7,45 constante) de cultivo.

Además de lo propuesto por la ISCT, también se debe tener en cuenta dos aspectos adicionales para clasificarlas como células madre: 1) que las CMM realicen procesos de autorenovación, es decir, pueden generar copias idénticas de sí misma y 2) que sean capaces de desarrollar «plasticidad clonogénica» o diferenciación hacia tejidos de diferentes capas embrionarias como ectodermo y endodermo.

En el año 2000 la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT) concluye que el término "célula troncal" para denominar a estas células adherentes al plástico no tiene mucho soporte, si bien el término MSCs (*mesenchymal stem cells*) está arraigado en todos los científicos del área, se sugiere utilizar el término "Células Estromales Mesenquimáticas Multipotentes", se pueden seguir utilizando el acrónimo MSCs pero con este concepto detrás (Horwitz y col., 2005). Según esto el término correcto para las células troncales derivadas del tejido adiposo es "células estromales derivadas del tejido adiposo" (ADSCs) pero lo más común actualmente es denominarlas ASCs como acrónimo y BM-MSCs a las células troncales derivadas de la médula ósea, aunque a estas últimas se les sigue denominando MSCs en forma genérica. Actualmente en español se definió como el acrónimo de CMM-TA, células madre estromales multipotentes derivadas del tejido adiposo.

Las primeras CMM aisladas y caracterizadas, fueron obtenidas del estroma de la médula ósea humana (MO) en los años 60 (Verfaillie, 2002) con una proporción de 1:34.000 células mononucleares; producto de su investigación se ha sugerido su utilización en medicina regenerativa en diversas patologías.

Entre las fuentes alternativas para obtener CMM tenemos al tejido adiposo, este se deriva del mesodermo embrionario y contiene un estroma que puede ser aislado con facilidad (Lasso y col., 2010).

La aspiración del tejido adiposo (liposucción) es generalmente mejor aceptado por el público que la de la médula ósea, ya que es un procedimiento menos invasivo y menos doloroso. Asimismo, el tejido adiposo es uno de los más abundantes del cuerpo humano, su acceso es sencillo (subcutáneo), el procesado es fácil de realizar y en la mayoría de las personas es posible extraer varios mililitros de grasa sin perjuicio estético (Hedrick y col., 2003).

La liposucción es uno de los procedimientos de cirugía estética más realizados en el mundo y, aunque su objetivo original consiste en retirar la grasa no deseada, actualmente puede establecerse como un procedimiento eficaz para obtener la fracción vascular estromal que contiene gran cantidad de CMM (Gimble y col., 2002a).

Las CMM-TA, cumplen con las condiciones establecidas por la ISTC y poseen ventajas en su aislamiento el cual es más sencillo, económico y de menor riesgo para el paciente, en comparación a las CMM de médula ósea (Pineda y Londoño, 2009).

La realización de esta investigación permitió optimizar y estandarizar una metodología más eficiente para el aislamiento y cultivo de las CMM provenientes del tejido adiposo; para su posible uso en protocolos de terapia celular, tal como el protocolo regeneración ósea que se lleva a cabo actualmente en la Unidad de Terapia Celular (UTC) del IVIC a través del implante de CMM en paciente con problemas de Pseudoartrosis.

1.1) Células Madre, definición y su clasificación

Definición: Se puede definir a una célula madre como: “es toda aquella célula que no está totalmente diferenciada, tiene capacidad de división ilimitada y cuando se divide, cada célula puede permanecer como célula madre o puede iniciar una vía que conduce de forma irreversible a su diferenciación terminal” (Ailhaud y Grimaldi, 1992).

Clasificación de células madre:

Las células madre se pueden clasificar de dos maneras, por su potencialidad y su origen.

Clasificación según su potencialidad

Por su potencialidad se pueden dividir en: totipotente, son aquellas que en las condiciones apropiadas son capaces de formar un individuo completo, pues pueden producir tejido embrionario y extra-embrionario. Así en el ciclo evolutivo post-fecundación, el cigoto u óvulo fertilizado se considera una célula totipotente, capaz de dar origen a todo el organismo; pluripotente, son las que tienen la capacidad de diferenciarse a tejidos procedentes de cualquiera de las 3 capas embrionarias originan todos los tipos de células y tejidos del organismo mas no un ser vivo completo. En esta categoría estarían las células provenientes de la masa celular interna del blastocisto y multipotente, que pueden diferenciarse en distintos tipos celulares procedentes de las misma capa embrionaria, lo que las capacitaría para la formación de tipos celulares diferentes, pero no de todos, como las células madre adultas.

Clasificación según su origen

Por su origen se dividen en: células madre embrionarias (CME), que derivan de la masa celular interna del blastocito y las adultas (CMA) que se encuentran en los tejidos del individuo tales como: las células madre hematopoyéticas (CHM) y las células madre mesenquimales (CMM). En la figura 1 Se presenta un

esquema indicando el origen de las células madre hasta su ruta de especialización a células diferenciadas de distintos tejidos.

- Células madre Embrionarias: estas células poseen la capacidad de generar cualquier célula diferenciada en el organismo (pluripotente) y se encuentran en la masa celular de la cavidad interna del embrión denominada blastocelo; para el aislamiento de estas células, se extraen del blastocisto por micropunción y se coloca las células de la masa celular interna del blastocito en una placa de cultivo que contiene un caldo rico en nutrientes. Al carecer de la estimulación necesaria para diferenciarse, comienzan a replicarse, mientras que mantienen su capacidad de convertirse en cualquier tipo de célula del cuerpo humano. Finalmente, estas células no diferenciadas pueden ser estimuladas *in vitro* para crear células especializadas (Campagnoli y col. ,2001).

- Células madre adultas (CMA)

Células madre hematopoyéticas (CMH): entre los tipos de células madre adultas las CMH han sido las mejor estudiadas. Desde principios del siglo XX se cree que las CMH derivan de un precursor más primitivo, común con el linaje endotelial, al que se le denomina hemangioblasto, cuya existencia ha sido confirmada por diversos estudios experimentales en distintos estadios de desarrollo (Pelosi y col., 2002). La hematopoyesis se inicia en el embrión del mamífero en el saco vitelino (semana 5 de gestación en humanos). Sin embargo, los precursores hematopoyéticos del saco vitelino

sólo son los responsables de la hematopoyesis embrionaria, y no dan origen posteriormente a las CMH presentes en el adulto. De hecho, la capacidad de los progenitores primitivos (CD34+/CD117+) aislados del saco vitelino para contribuir a la hematopoyesis en adultos es limitada.

Las CMH responsables de la hematopoyesis definitiva en adultos se originan en la región del mesodermo denominada aorta-gónada-mesonefros (AGM), derivada de la esplacnopleura para-aórtica. Tras el saco vitelino, la hematopoyesis tiene lugar en el bazo, hígado y nódulos linfáticos, hasta el momento en que se desarrolla la médula ósea, que eventualmente asume la tarea de producir células sanguíneas para todo el organismo adulto. Las CMH de la médula ósea se hallan en una concentración aproximada de 1 por cada 34.000 células mononucleares (Gimble y col., 2002b), también pueden obtenerse de la sangre periférica, ya que son capaces de abandonar la médula ósea y pasar a la circulación sanguínea, en un proceso denominado movilización de CMH.

Las CMH se caracterizan por su pequeño tamaño, un núcleo respecto al citoplasma, la ausencia de marcadores de linaje, un bajo contenido de colorantes vitales y la presencia de varios marcadores de superficie, entre los que se encuentran CD14, CD34, CD117 y CD133. Una población celular altamente enriquecida con CMH puede obtenerse mediante selección por citometría de flujo de células que expresan alguno de dichos marcadores (tradicionalmente CD34). Sin embargo, ninguno de ellos por sí solo, ni en combinaciones

simples, permite identificar específicamente una CMH. En aplicaciones clínicas, éstas células son las únicas que han sido aprobadas para su uso en tratamientos de terapia celular para algunas patologías (Bernard y Lloyd, 2005).

Células madre Mesenquimales (CMM) o (MSC, del inglés *Mesenchymal Stem Cells*): Poseen este nombre porque se derivan de la lámina del mesotelio del embrión. Son células multipotentes de morfología fibroblastoide precursoras de todos los tipos de tejidos conectivos no hematopoyéticos (hueso, grasa, cartílago, etc.) (Pittenger y col., 1999). Las CMM no se encuentran sólo en la médula ósea, sino también en el estroma de virtualmente todos los órganos, como en el tejido adiposo subcutáneo (Zuk y col., 2002) o el cartílago articular (Butler y col., 2000). Las CMM se obtienen generalmente mediante selección por adherencia a plástico de cultivo celular, pues son capaces de adherirse y crecer en condiciones en las que otros tipos celulares habitualmente no proliferan. Estas células son caracterizadas por la expresión en su superficie de diversas moléculas tales como: CD9+/CD13+/CD29+/CD14-/CD34-/CD44+/CD45-/CD90+/CD105+.

Debido a su elevada capacidad de proliferación *ex vivo* (a diferencia de las CMH) y a su amplio potencial de diferenciación, las CMM son uno de los tipos de CM más empleados en terapia celular regenerativa. Además, en determinadas condiciones experimentales, las CMM han mostrado la capacidad de diferenciarse en linajes celulares no conectivos, tales como el endotelial y el neuronal (Ashjian y col., 2003). Las CMM también son negativas para el marcador HLA-DR,

molécula clase II del MHC (complejo de mayor histocompatibilidad), por lo tanto sugiere la capacidad de ser utilizadas como un alotrasplante (donante y el receptor son de la misma especie pero no son genéticamente iguales) donde no tendrá problemas de rechazo del trasplante, abriendo un gran campo en las aplicaciones terapéuticas con este tipo de células.

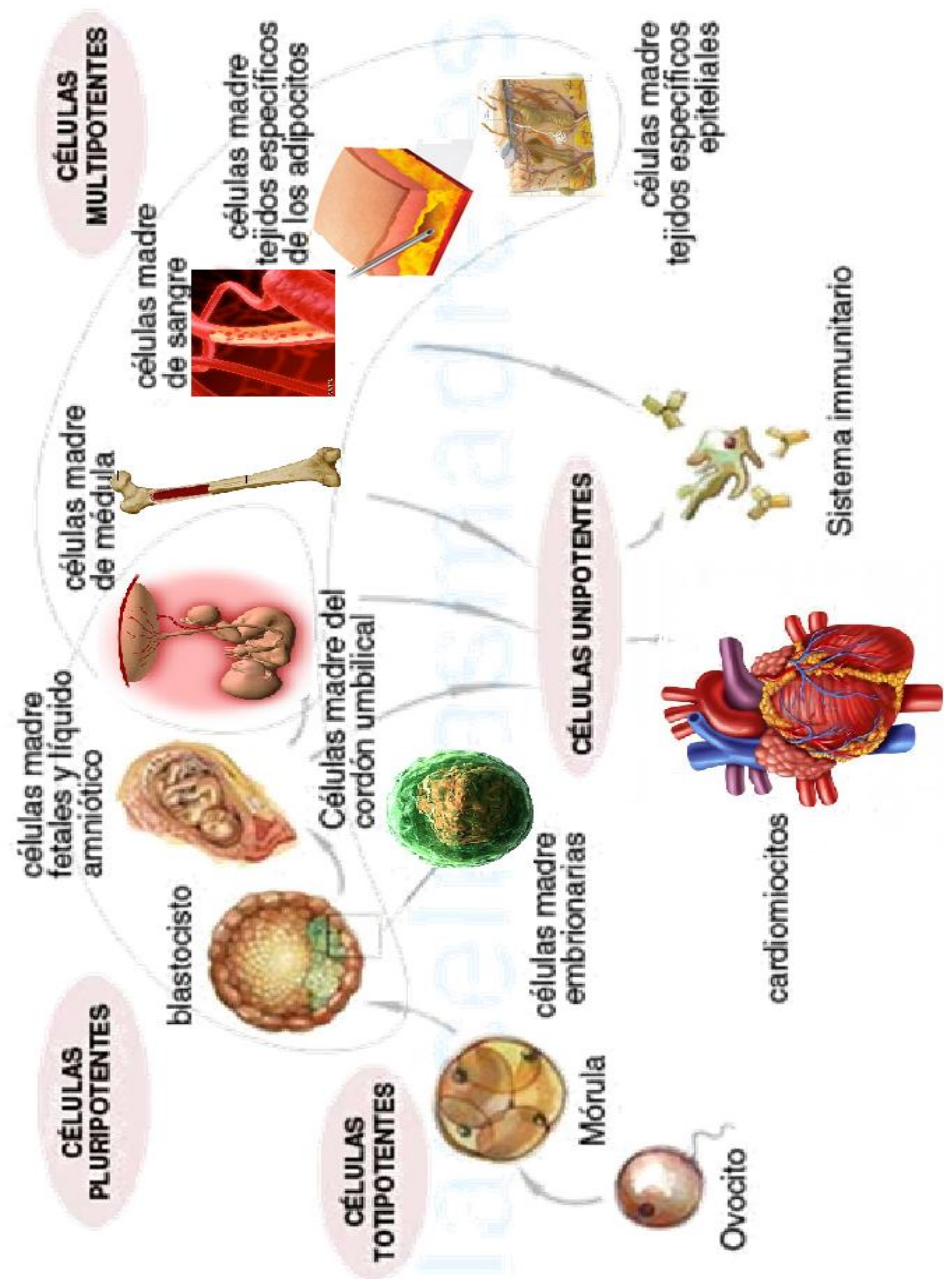


Figura 1. Modelo jerárquico de las células madre de acuerdo a su origen. Se muestra desde la formación del cigoto hasta como se diferencian en líneas celulares específicas de cada tejido. Tomado y modificado de <http://delatandoalaciencia2.blogspot.com/p/definicion-y-tipos.html> en línea el día 22/03/14.

1.2) Fuentes de obtención de células madre mesenquimales

Las CMM residen en diversos tejidos, las primeras CMM se aislaron a partir de médula ósea (MO) hace aproximadamente 4 décadas, desde entonces se ha considerado este órgano como la principal fuente de obtención de dichas células. No obstante, la MO como fuente de aislamiento de estas células presenta limitaciones, como el bajo número de CMM presentes en ella, el riesgo en la toma de la muestra para el paciente por ser un procedimiento invasivo y la disminución de la capacidad de proliferación y diferenciación según la edad del donante; razones por las cuales fuentes alternativas menos invasivas como la sangre de cordón umbilical y el tejido adiposo han tenido acogida para lograr el aislamiento y cultivo de estas células (Kern y col., 2006). Se ha reportado que por cada gramo de tejido adiposo se pueden obtener 5000 CMM (Lasso y col., 2010), esta cifra es muy superior a la que se obtiene a partir de MO. En la figura 2, se muestra las fuentes de CMM más utilizadas. Estudios posteriores revelaron gran similitud biológica entre las CMM obtenidas de este tejido y las de MO han demostrado su habilidad para diferenciarse en células de diferentes tejidos haciendo que sean una opción alternativa para el aislamiento y cultivo de CMM. (Locke y col., 2011)

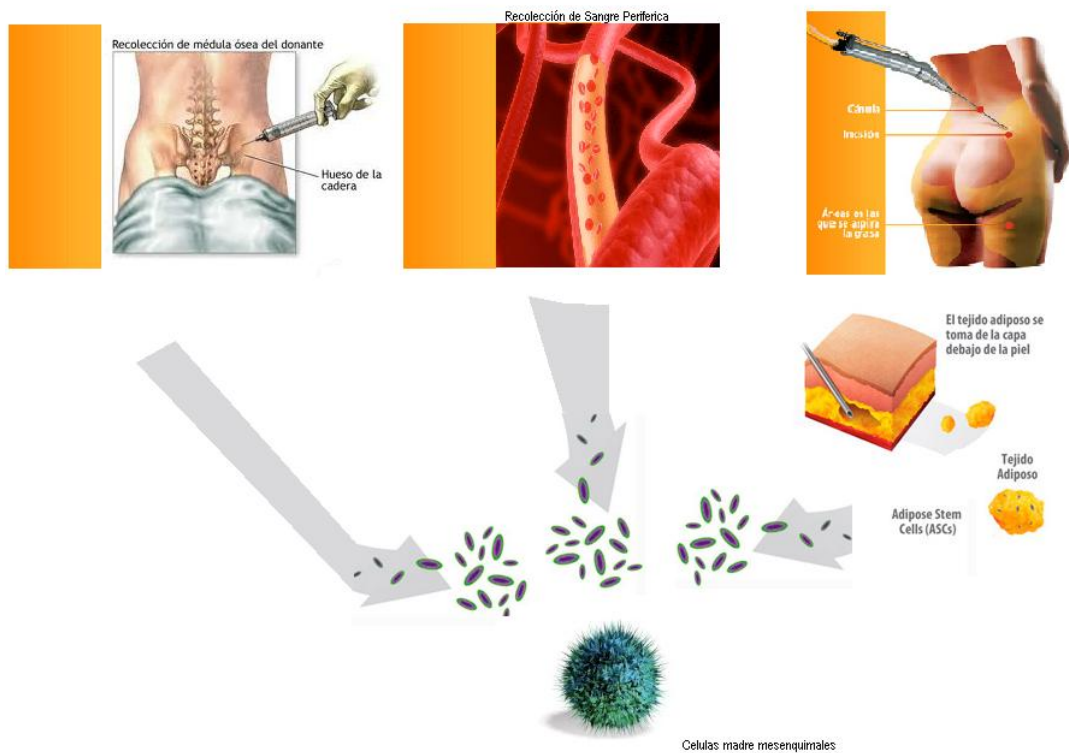


Figura 2. Fuentes de obtención de células madre mesenquimales en tejidos adultos como la médula ósea, sangre periférica y tejido adiposo. (Tomado y modificado de Locke y col., 2011)

1.3) Historia de la terminología de las células madre mesenquimales del tejido adiposo:

El término “*stem cells*” fue introducido por Ernest Haeckel en 1868, derivado de la palabra en alemán, “*stammzelle*” que significa en español célula primitiva (Ramalho y Willenbring, 2007). Este término fue utilizado en 1900 por Valentin Haecker para definir una célula precursora que con división asimétrica originaba varios tipos de células. En los años 1960 Friednestein y colaboradores, reportaron

de la existencia de un precursor celular en la médula ósea (en estado hematopoyético o germinal) con capacidad de autorenovarse y de originar células especializadas, el cual fue denominado como célula madre mesenquimal (Till y Mc. Culloch., 1963).

En el año 2000, en busca de una fuente alternativa para la obtención de CMM, se logra aislar células del tejido adiposo provenientes del remanente de una liposucción. Un grupo de investigadores liderado por el Dr. Gimble, describieron la capacidad *in vitro* de estas células de diferenciarse a tejidos osteogénicos y mineralizar una matriz extracelular cuando se las exponía a diferentes factores, demostrando la capacidad de diferenciarse de las células madre adultas residentes en el tejido adiposo (Gimble y col., 2002a). Sin embargo, la primera vez que se consideró la existencia de células progenitoras mesenquimales en el tejido adiposo subcutáneo (obtenido por liposucción) fue en el año 2001 cuando el grupo liderado por Zuk logró describir una población celular multipotencial. Su trabajo describe la existencia de un grupo de células homogéneas con aspecto fibroblástoide, obtenidas a partir de la fracción vascular estromal (FVS) del tejido adiposo; con capacidad de diferenciarse a osteocitos, condrocitos y adipocitos. A estas células las denominaron con el nombre de PLA (del inglés, *Processed Lipoaspirated cells*, células procesadas del lipoaspirado). Los investigadores obtuvieron un gran número de células a partir de una pequeña muestra de lipoaspirado, que cultivaron sobre placas de Petri durante 25 pasajes

aproximadamente, comprobando que cumplían con uno de los requisitos de células progenitoras, la autorenovación.

Además, analizaron el fenotipo de dichas células mediante la determinación de las moléculas presentes en su membrana y estudiaron su cinética de crecimiento; en ambos casos comprobaron que esta población celular cumplía los criterios estipulados para ser consideradas CMM, siendo su fenotipo muy similar al descrito para las CMM de médula ósea. (Horwitz y col., 2005)

Durante los últimos años, este grupo de CMM proveniente de tejido adiposo han sido denominadas con numerosos nombres en la literatura científica, entre los que podemos destacar: ADAS: *Adipose-Derived Adult Stem cells* (Pettersson y col., 1985); ADSC: *Adipose Derived Stem Cells* (Gaustad y col., 2004); ATSC: *Adipose Tissue Stem Cells* (Mahendroo y col., 1993); MADS: *Multipotent Adipose-Derived Stem cells* (Rodríguez y col. 2005); ASC: *Adipose Stem Cells* (Safford y Rice, 2005).

En el año 2004, en el Congreso internacional de la IFATS (*Internacional Federation for Adipose Therapeutics and Science*) se decidió unificar las diferentes nomenclaturas, dando como acrónimo en inglés ASC a las células mesenquimales derivadas de la fracción vascular estromal del tejido adiposo. A pesar de ello, algunos grupos de investigación no han aceptado este consenso y mantienen la nomenclatura anterior (Schäffler y Büchler, 2007).

1. 4) Caracterización de las células madre mesenquimales de tejido adiposo

Las características que definen a una CMM según la ISCT en el año 2006 son las siguientes: deben ser células con morfología fibroblastoide, con capacidad de adhesión al plástico, con capacidad de autorenovación por largos periodos de tiempo y multipotencialidad, ya que se pueden diferenciar a linajes celulares adipogénico, condrogénicos y osteogénicos. La ISCT además, estableció un listado de marcadores de membrana celular para identificarlas, dado que no existe hasta ahora un marcador específico para este tipo de células; dentro de este listado de marcadores se propuso que deberían tener un marcaje positivo para CD73, CD90 ,CD105 y un marcaje negativo para CD34, CD45, HLA-DR.

Adherencia al plástico:

La adhesión al plástico es una de las propiedades más importantes de las CMM-TA, esta propiedad permite su fácil cultivo en placas de plástico, se realiza mediante una secuencia de eventos, donde interaccionan una gran variedad de proteínas del citoesqueleto, matriz y membrana celular entre las que se incluyen: integrinas, receptores de factores de crecimiento y moléculas de adhesión (Zuk y col., 2001).

Expresión de marcadores de membrana celular para la identificación de células madre mesenquimales del tejido adiposo:

El fenotipo de las CMM-TA se determina mediante la evaluación de su inmunofenotipaje por medio de anticuerpos monoclonales específicos contra diferentes moléculas y su análisis a través de la técnica de citometría de flujo. Los anticuerpos utilizados para identificar el fenotipo de una CMM se presentan en la tabla 1.

Tabla 1. Algunas moléculas expresadas en la superficie utilizados en conjunto para la caracterización de las CMM de tejido adiposo.

Expresión Positiva (+)	Expresión Negativa (-)
CD29	CD14
CD90	HLA-DR
CD73	CD45
CD105	CD19

Expresión positiva de las células madre mesenquimales del tejido adiposo

- CD90: conocido como Thy-1, con un peso de 90 KDa; es expresado por células madre hematopoyéticas y mesenquimales, neuronas, tejido conectivo, células T periféricas, endotelio entre otras líneas celulares; su función es mantener estados de inhibición e indiferenciación de las células

madre hematopoyéticas y mensesquimales, además de participar en la coestimulación de los linfocitos (Kindt y col., 2006).

- CD73: es una glicoproteína anclada por GPI monocatenaria de aproximadamente 70 KDa, posee expresión en células del desarrollo embrionario, en células epiteliales y endoteliales; regula la disponibilidad de adenosina para la producción de AMP cíclico (Kindt y col., 2006).
- CD29: es una integrina $\beta 1$ asociada en las interacciones de adhesión celular y reconocimiento de señales en diversos procesos como la embriogénesis, la homeostasis, la reparación tisular, la respuesta inmune y la difusión metastásica de células tumorales (Kindt y col., 2006).
- CD105: o también llamada endoglina, es una glicoproteína que forma parte del complejo del receptor de TGF- β y que interviene en la regulación de distintos componentes de la matriz extracelular como fibronectina y colágeno. Mayormente se expresa en células endoteliales, monocitos y precursores de células madres adultas. En el caso de su expresión en CMM se sugiere que es determinante en la generación de cardiomiocitos (Kindt y col., 2006).

Expresión Negativa de las células madre mesenquimales del tejido adiposo

- CD14: es un marcador hematopoyético, con una masa molecular de 55 KDa, es un receptor del complejo de lipopolisacárido y LBP. Se expresa específicamente en células mielomonocíticas (Kindt y col., 2006).

- CD19: es un coreceptor de células B de 95 KDa, su función como receptor es asociarse a CR2 y CD81 a la vez, su dominio citoplasmático une a las tirosinas quinasas citosólicas y a la PI-3 kinasa; solo se expresa en células B (Kindt y col., 2006).
- CD45: es una proteína tirosina fosfatasa localizada en células hematopoyéticas excepto plaquetas y eritrocitos; su función es modificar las señales de otras moléculas de superficie (Kindt y col., 2006).
- HLA-DR: es un receptor de superficie celular clase II del MHC; es un heterodímero $\alpha\beta$ que posee dos unidades de dos cadenas, una de 27 KDa y otra de 36 KDa. Se expresa principalmente en células presentadoras de antígenos (Kindt y col., 2006).

1.5) Diferenciación de las células madre mesenquimales del tejido adiposo

La capacidad de diferenciación de las CMM-TA, depende de los factores inductores de diferenciación del microambiente del medio donde se encuentren, Este puede inducir cambios en la expresión génica de las células, modificando su fenotipo y dirigiéndose a una línea celular específica como osteoblastos, condroblastos y adipoblastos; comprobando su multipotencia (Noël y col., 2007).

Osteogénesis: para el desarrollo de tejido conectivo óseo a partir de las CMM-TA se necesita un medio con factores que induzcan esta diferenciación como son dexametasona, ácido ascórbico y β -glicerol fosfato, al interactuar las células con estos factores empiezan a secretar matriz ósea sin calcificar como un osteoprogenitor comprometido hacia

preosteoblasto y luego osteocitos, donde probablemente ya sea visible el cambio de fenotipo y se pueda evaluar mediante tinciones que detecten depósitos de calcio (Lasso y col., 2010).

Condrogénesis: para diferenciarse a condrocitos se seleccionan las CMM-TA con medios con factores como son ácido ascórbico, TGF β 1 donde luego de interactuar forman redes de colágeno II y proteoglicanos asociados a condrocitos (Lasso y col., 2010).

Adipogénesis: para diferenciarse en tejido adiposo que contiene lípidos que almacenan energía, se colocan las CMM-TA a medio suplementado con dexametasona, isobutylmetilxantina e insulina que promueven la excreción de moléculas donde comprometen a las CMM-TA a un linaje adipogénico hasta transformarse en adipocitos; mediante tinción pueden ser detectadas las gotas de lípidos presentes en el citoplasma de la célula (Goldrick, 1967).

1.6) Propiedades Inmunomoduladoras de las células madre mesenquimales del tejido adiposo

Se ha descrito que las CMM poseen propiedades inmunomoduladoras, lo cual aumenta el interés para su uso en terapia celular en enfermedades autoinmunes y crónicas entre otras (Bartholomew y col., 2002). Por ejemplo, en los trasplantes de órganos, un problema crítico de la terapia celular es el rechazo resultante de la incompatibilidad inmunológica entre el donante y el receptor (Wagner y Eferl, 2003). La demostración *in vitro* de que las células mesenquimales no expresan los antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II y que suprimen la reacción de proliferación en el cultivo mixto de linfocitos, ha sugerido que estas células podrían suprimir las reacciones inmunes inducidas y constituyen un potencial terapéutico en la enfermedad de injerto contra huésped (Tse y col., 2003). Por otra parte, la ausencia de MCH clase II plantea su uso de manera heteróloga sin riesgo a producirse rechazo.

Además de las propiedades regenerativas de las CMM, éstas también afectan el funcionamiento del sistema inmune. Estudios realizados demuestran que las CMM pueden inhibir la proliferación de linfocitos inducida por aloantígenos, mitógenos como fitohemaglutinina y concavalina A (Le Blanc y col., 2003; Aggarwal y Pittenger, 2005) y anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28. Durante la maduración de las células dendríticas, las CMM pueden inhibir la expresión de moléculas involucradas en la presentación de antígenos como CD1a, CD40, CD80, CD86 y HLA-DR (Zhang y col., 2008) y en cocultivo con

células mononucleares de sangre periférica, incrementan la proporción de subpoblaciones de linfocitos T con fenotipo de células reguladoras como CD4+/CD25^{high}, CD4+/CTLA-4+, CD4+/CD25+/CTLA-4+ (Maccario y col., 2005).

Se ha demostrado que las CMM humanas liberan citocinas inmunosupresoras, como el factor de crecimiento del hepatocito, la interleucina 10 y el TGF- β 1, en concentraciones que suprimen la alorespuesta *in vitro*. También expresan ciclooxigenasas 1 y 2 y producen prostaglandina E2 constitutivamente. Estudios de bloqueo con indometacina confirman que las prostaglandinas contribuyen a la alosupresión mediada por estas células (Tse y col., 2003; Le Blanc y col., 2003). El IFN-gamma (citocina proinflamatoria) no es capaz de revertir la supresión que inducen las CMM sobre la proliferación linfocitaria por estimulación alogénica, pero sí es capaz de regular o revertir sus efectos sobre los factores de crecimiento del hepatocito y TGF- β 1. Estudios de cocultivo o cultivo entre células alogénicas *in vitro*, tanto en modelos animales como humanos, en presencia de CMM, demuestran que los factores solubles derivados de estas últimas modulan la respuesta inmune y sugieren que esto genera un microambiente inmunosupresor capaz de modular la alorespuesta aún en presencia de IFN-gamma (Le Blanc y col., 2003).

Tres mecanismos fundamentales contribuyen al efecto supresor sobre la reacción alogénica; 1) son hipoinmunogénicas, pues no expresan antígenos de clase II y otras moléculas coestimuladoras; 2) previenen la respuesta de las células T indirectamente a través de la modulación de las células dendríticas y actúan

directamente inhibiendo la función de las células NK (inhibiendo la proliferación y producción de IFN) y las células T CD4+ (induciendo un fenotipo regulador); 3) inducen un microambiente supresor local a través de la producción de prostaglandinas e interleucina-10, así como por la expresión de indoleamina-2,3-dioxigenasa, que depleta de triptófano el medio local (Aggarwal y Pittenger, 2005). Esta acción inmunoreguladora es comparable con la referida en la tolerancia materno-fetal y muy similar a la descrita en los mecanismos de las células tumorales para evadir a la respuesta inmunológica (Tse y col., 2003). En la figura 3, se presenta un esquema de los efectos de las CMM sobre algunas células del sistema inmune.

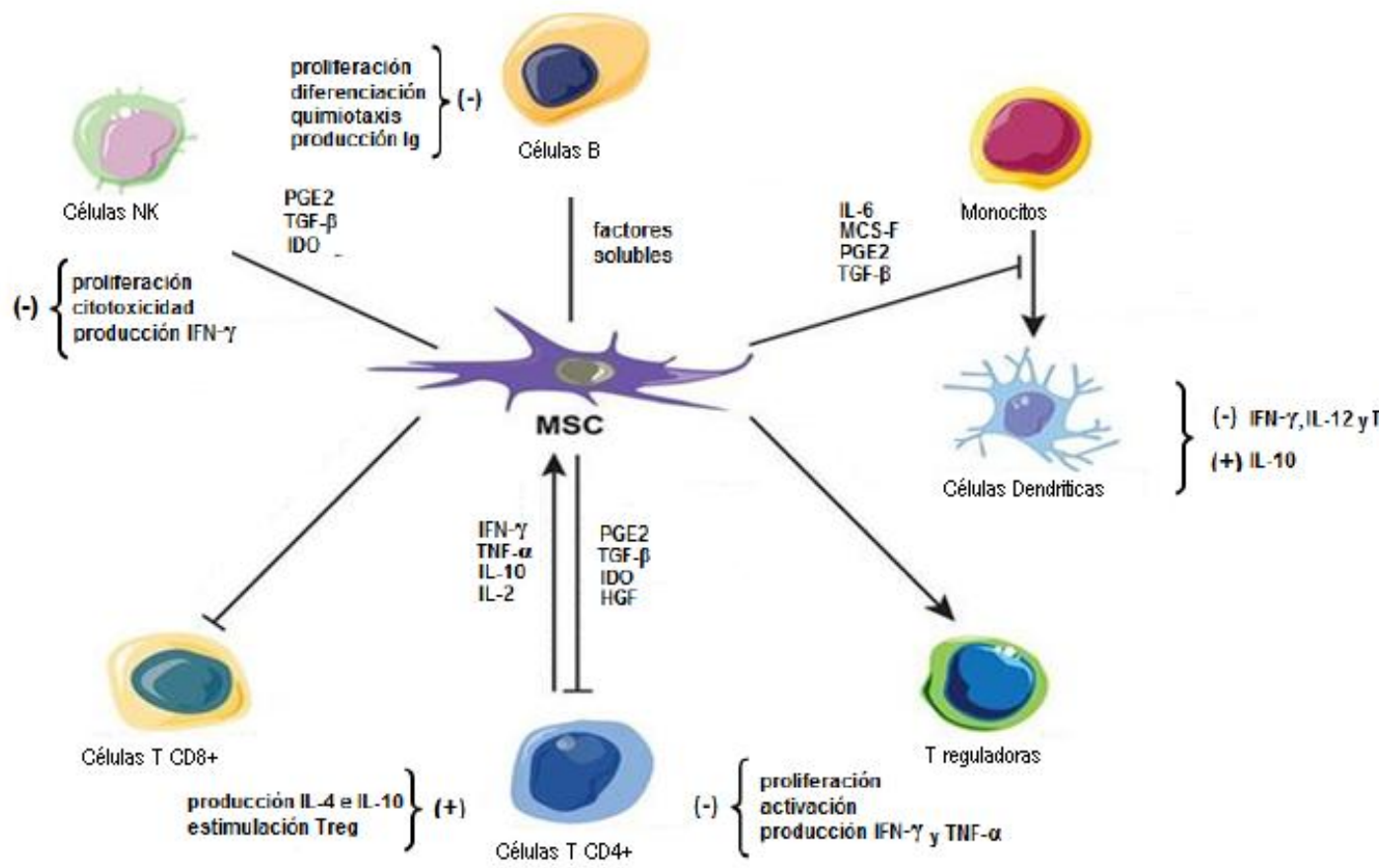


Figura 3. Efectos inmunomoduladores de CMM en diferentes células del sistema inmune. (Tomado y modificado de, Wagner y Eferl., 2003).

1.7) Tejido adiposo: El tejido adiposo se considera un órgano de gran actividad metabólica, aproximadamente el 15% del peso corporal de una persona adulta, esta compuestos por lípidos, que representa una importante reserva energética (Finn, 1997).

Origen y desarrollo del tejido adiposo en humano

Tejido adiposo fetal

El neonato posee un 14% de grasa corporal (Enzi, 1981) la cual se forma en el feto a partir de las 14 semanas (Poissonnet, 1983). El aumento posnatal es brusco entre el primer y tercer mes (Hager, 1977).

Tejido adiposo adulto

Es uno de los tejidos más abundantes, representa alrededor del 15-20 % del peso corporal del hombre y del 20-25 % del peso corporal de la mujer. En un adulto normal el número de adipocitos es constante y las variaciones de peso tienen lugar por modificaciones en el tamaño de las células adipogénicas.

En los últimos veinte años ha habido un enorme interés en conocer los mecanismos por los que se desarrolla el tejido adiposo blanco, en parte debido al incremento de la frecuencia de obesidad en adultos que se viene observando en las sociedades occidentales, ya que se cree que el origen de esta obesidad podría estar en alteraciones nutricionales de consecuencia irreversible acaecidas en un período crítico del desarrollo perinatal del tejido adiposo blanco (Knittle, 1968).

Tipos de tejido adiposo

*Tejido adiposo **blanco** o amarillo unilocular* cuyas células contienen una sola gota de lípidos. La formación del tejido adiposo blanco comienza antes del nacimiento pero en desarrollo es un proceso continuo a lo largo de la vida del individuo, generalmente se acumula en el tejido subcutáneo, la capa más profunda de la piel, su forma es de una célula poliédrica con una sola gota de lípido (mayoritariamente el lípido compuesto por triglicérido) y su función es de protección y almacenamiento de energía.

*El tejido adiposo **marrón** o grasa parda* es también llamado tejido multilocular es más escaso el tejido adiposo blanco. Su principal función es proporcionar calor por medio de la termogénesis (generar calor por reacciones metabólicas) y la movilización de reservas energéticas en forma de triglicérido. Sus células son poligonales y más pequeñas que las del tejido adiposo unilocular, su citoplasma contiene muchas gotas de lípidos de diferentes tamaños y distribuidas aleatoriamente en todo el citoplasma.

No está claro cuál es el tipo de tejido que da origen a las células adiposas. Se sabe que todas las células adiposas se originan por diferenciación de células mesenquimáticas primitivas, pero el proceso para los dos tipos de tejido adiposo es diferente. El tejido adiposo blanco comienza a desarrollarse en el quinto mes de vida fetal en los islotes grasos. El proceso se inicia con la aparición en el tejido conectivo de invaginaciones vasculares de lóbulos de adipocitos. Los fibroblastos

incluidos en los lóbulos empiezan a acumular lípidos hasta llegar a la morfología típica de adipocitos maduros, así los lóbulos aumentan de tamaño y quedan separados por tejido conectivo y un abundante red capilar cuyo calibre cada vez es menor al aumentar el tamaño del lóbulo (Hausman y Hausman, 2006).

En las células mesenquimáticas típicas aparecen gradualmente más gotas grasas y las células se van haciendo más redondeadas, las gotas de lípido se van haciendo más grandes, para finalmente fusionarse en una gran vacuola lipídica, logrando hacer el núcleo cada vez más excéntrico.

La formación de células adiposas en la especie humana tiene lugar durante el segundo trimestre de gestación (Ailhaud y Grimaldi, 1992). Se caracterizan por su aspecto fibroblástico que contiene abundante retículo endoplasmático, un alto índice núcleo/citoplasma, localización perinuclear de la mitocondria y la presencia de muchas vacuolas lipídicas (Gimble y col., 2007). Su diferenciación celular procede de la manera siguiente: adipoblasto → preadipocito → adipocito inmaduro → adipocito maduro (Figura 4). En el tejido adiposo los precursores coexisten en conjunto con células adiposas maduras, fibroblastos, células sanguíneas, células endoteliales, pericitos y células mesenquimales indiferenciadas (Hausman y Hausman, 2006).

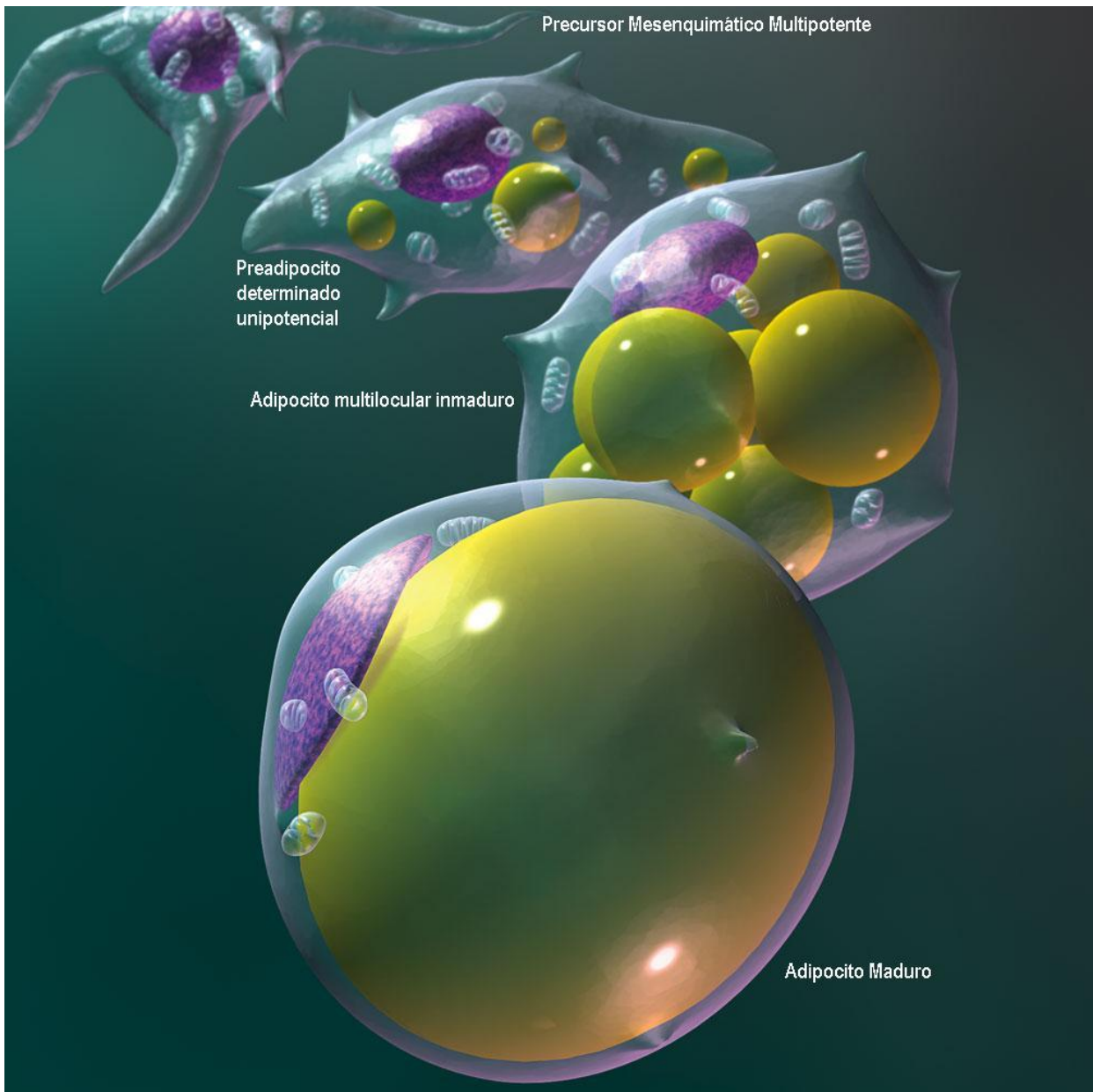


Figura 4. Secuencia de diferenciación del adipocito. El precursor mesenquimático es pluripotente, se encuentra en el tejido adiposo adulto y puede diferenciarse en otro linaje mesodérmico (*Tomado y modificado de Hausman y Hausman, 2006*).

1.8) Aplicaciones Clínicas de las células madre mesenquimales

Durante las últimas décadas, el uso de CMM como terapia celular ha sido propuesta como una estrategia útil en el tratamiento de diversas enfermedades, estas células son capaces de diferenciarse en múltiples líneas celulares. Su fácil expansión *in vitro* hacen de ella una fuente para su uso en la medicina regenerativa. Las CMM son células regenerativas que se encuentran en cada uno de los tejidos y que responden a señales de diferenciación en células mayormente de linaje mesodérmico.

Las CMM se han empleado inicialmente para inducir la reparación ósea en defectos importantes de huesos y otras enfermedades, donde se han obtenido aparentemente buenos resultados experimentales. Ejemplos de terapia con CMM son la importancia local de dicha célula para reparar cartílago y hueso. Por otra parte, han sido publicados estudios de regeneración local en miocardio con CMM (tejido muscular del corazón) y aunque se ha reportado que ha mejorado la función de este musculo, estos resultados son cuestionados en la actualidad. (Schäffler y col., 2007).

A diferencia de los estudios pre-clínicos y clínicos con CMM de otras fuentes, como médula ósea, cuyo único uso aprobado por un organismo como la FDA es el trasplante de células madre hematopoyéticas, la investigación en humanos con las CMM-TA, ha sido menos explorado, pese a que en los últimos años están surgiendo ensayos pre-clínicos y clínicos cuyos resultados habrá que evaluar muy detalladamente.

Un estudio realizado utilizando CMM-TA reveló que éstas células disminuyen la respuesta inflamatoria y la respuesta de células T, e inducen la generación de células T reguladoras *in vitro* en pacientes con artritis reumatoide (González y col., 2010; Caplan y col., 2013).

García-Olmo y colaboradores en el 2009 Realizaron un estudio utilizando CMM-TA para el cierre de fístulas enterocutáneas en pacientes con enfermedad de Crohn. En este estudio 9 pacientes recibieron dos infusiones de 2×10^6 células por kg de peso, los pacientes mostraron una disminución de la actividad de la enfermedad en 6 semanas de seguimiento.

En otras enfermedades como osteoartritis y osteonecrosis se ha investigado una terapia con CMM-TA sin el uso de esteroides, pese a que no está claro el modelo a realizar, ni la ruta de acción de estas células, proponen que este tratamiento reduce la inflamación causada por la enfermedad (debido a sus propiedades inmunomoduladoras). Los pacientes tratados después de 12 semanas, presentaron un 30% de disminución de la inflamación, se han descrito hasta la fecha dos pacientes exitosos (Caplan y col., 2013; Davatchi y col., 2011).

Se han realizado modelos de regeneración no solo en humanos, sino también hay tratamientos experimentales en caninos, para el estudio de la regeneración de inserción de disco en la columna y del estudio de la capacidad inmunomoduladora de las CMM (Ganey y col., 2009)

Sobre la base de los reportes preliminares de seguridad y eficacia la terapia con CMM autólogas, si se utilizan en fase de cultivo primario o las células expandidas *in vitro*, representan un método para tratar enfermedades que actualmente no se ha conseguido buenos resultados utilizando otras terapias, o las utilizadas dan resultados generalmente insatisfactorios o requieren de cirugías invasivas. Sin embargo, más datos clínicos son necesarios para determinar la distribución *in vivo* y los mecanismos terapéuticos de las CMM, de manera de optimizar su uso como parte de una estrategia personalizada en la medicina regenerativa. Sin embargo, este proceso requerirá de la colaboración interdisciplinaria de los médicos, los científicos, la industria y los organismos reguladores para traducir los avances preclínicos en tratamientos con futuras aplicaciones clínicas (Caplan y col., 2013).

2. ANTECEDENTES

El aislamiento de CMM del tejido adiposo se inició con los trabajos de Zuk y colaboradores en el 2001, quienes demostraron que a partir del del remanente de procesos de cirugías estéticas como dermolipólisis y liposucciones, era posible aislar y caracterizar estas células madre a lo largo de su cultivo, llegando a la conclusión que la liposucción era el procedimiento más efectivo con respecto al rendimiento en el aislamiento de CMM a diferencia de otros procedimiento para la obtención de la grasa.

La cantidad de CMM-TA que se puede obtener a partir de los lipoaspirados es mucho mayor comparado con los de médula ósea, alrededor de 2×10^6 células/mL de lipoaspirado (Zuk y col., 2001). Así pues, mientras que de un gramo de grasa se extraen aproximadamente 5.000 células, la cantidad de CMM-MO que se puede obtener es de 10 a 100 células por gramo de médula ósea (Lasso y col., 2010). Esto abre la posibilidad de que puedan ser implantadas sin la necesidad de mantenerlas en cultivo durante largos periodos de tiempo para expandirlas, lo cual puede ser problemático por la posibilidad de contaminaciones microbianas, alteraciones celulares, introducción de productos animales (derivados del SFB utilizado durante el cultivo) y otros posibles errores humanos. Además, comparado con las CMM-MO, las CMM-TA crecen más rápidamente y pueden mantenerse más tiempo en cultivo sin que presenten signos de senescencia (Kern y col., 2006). Todo esto hace que el tejido adiposo sea considerado una fuente rica en células madre (Zuk y col., 2001).

Posteriormente, en el año 2007 Gimble y colaboradores, tomaron como base en cuenta los datos suministrados por Zuk y colaboradores mejoraron la técnica de aislamiento. La liposucción tumescente, que consiste en que los cirujanos plásticos infunden los tejidos subcutáneos con una solución salina que contiene anestésico y/o epinefrina a través de una cánula y por medio de succión se obtiene el tejido adiposo. Gracias a este procedimiento se generan fragmentos de tejido finamente picado, el tamaño de los cuales depende de las dimensiones de la cánula, de estos fragmentos pueden obtenerse CMM haciendo o no digestión enzimática, pero realizando un procedimiento previo de lisis de eritrocitos (Kern y col., 2006) y un lavado previo a la digestión enzimática para aumentar el rendimiento y una alta viabilidad hasta por 5 pases de cultivo (Gimble y col., 2007); además determinaron 4 criterios que deben cumplirlas CMM-TA para puedan ser utilizadas con fines médicos, estos fueron: Presencia de células en cantidades muy abundantes (millones a billones de células); fáciles de aislar con procedimientos mínimamente invasivos; diferenciarse en múltiples linajes celulares de manera regulable, reproducible y trasplantables en forma autóloga o alogénica. Colocando el tejido adiposo, que cumple con todos los criterios mencionados, postulándolo como una fuente alternativa de células madre.

El estudio en profundidad de estos procesos de diferenciación conduciría a mejorar el desarrollo de aplicaciones clínicas. En este sentido, estas células pueden tener un papel importante en la reconstrucción de tejidos blandos. Por ejemplo, en el área de la cirugía plástica reconstructiva, donde se ven afectadas

grandes zonas de tejido blando, ya sea debido a un trauma o por una resección quirúrgica (por ejemplo una mastectomía). Las CMM-TA están siendo utilizadas como complemento y con la finalidad de corregir defectos después de este tipo de cirugías, mejorando los contornos, disimulando cicatrices o aumentando el volumen de la zona intervenida (Lasso y col., 2010). Sin embargo, la reconstrucción de grandes áreas únicamente con trasplantes de grasa autólogos, conlleva ciertos problemas relacionados con la angiogénesis y el mantenimiento a largo plazo del volumen injertado.

En la actualidad todavía no se conocen los factores responsables de la señalización *in vivo* de las células madre multipotentes hacia linaje adipogénico. Se sabe que los glucocorticoides, IGF-1 (factor de crecimiento insulínico-1), IBMX (isobutil-metilxantina), dexametasona y otros compuestos similares que incrementan el nivel de AMPc (adenosín monofosfato cíclico) juegan un papel importante (Otto y Lane, 2005). De hecho, los medios de inducción para adipogénesis están habitualmente suplementados con estos factores (tabla 2).

En cuanto a los mecanismos moleculares que regulan la ruta de diferenciación adipogénica *in vitro* se sabe que es importante la expresión de ciertos genes o proteínas implicados en la biosíntesis y almacenamiento de lípidos, como por ejemplo: 1) incremento de la actividad GPDH (glicerol-3-fosfato deshidrogenasa), enzima implicada en la síntesis de triglicéridos; 2) aumento de la expresión de LPL (lipoproteína lipasa), enzima implicada en la hidrólisis de triglicéridos; 3) inducción de la expresión de PPAR γ (receptor gamma activado por

proliferadores peroxisomales), factor de transcripción implicado en el compromiso a preadipocitos; y 4) aumento de aP2 (proteína de adipocitos 2), proteína citosólica transportadora de lípidos, implicada en la acumulación de lípidos en los adipocitos maduros (Zuk y col., 2002).

3. JUSTIFICACIÓN

Las células madre mesenquimales provenientes de médula ósea han sido las más estudiadas y utilizadas en aplicaciones clínicas, sin embargo los avances en la terapia celular regenerativa han descrito la existencia de otras fuentes alternativas de mejor acceso y maleabilidad con el fin de optimizar el cultivo, caracterización y desarrollo de posibles aplicaciones clínicas, entre las fuentes alternativas la más importante en la actualidad es el tejido adiposo. El tejido adiposo puede ser obtenido mediante liposucción en grandes cantidades y con riesgo mínimo. La liposucción es el primer procedimiento que con mayor frecuencia que realizan los cirujanos plásticos, representando un 23,7 % de todos los procedimientos de cirugía estética (ASPS, 2013).

Al comparar las CMM provenientes de médula ósea con las obtenidas de tejido adiposo encontramos que estas últimas presentan evidentes ventajas como es el hecho que se puede obtener mayor cantidad de muestra y por ende de mayor número células debido a que su localización es subcutánea y de fácil acceso, además la técnica de extracción implica únicamente anestesia local, confiriendo menor riesgo al paciente durante la operación. Adicionalmente, las CMM-TA presentan la misma potencialidad y capacidad replicativa que las CMM de médula ósea. Pese a presentar gran cantidad de ventajas, aun no se ha definido una metodología estandarizada para su obtención. Por otra parte, es necesario el desarrollo a gran escala de técnicas para su procesamiento de acuerdo a los requerimientos de las Buenas Prácticas de Producción (*Good Manufacturing*

Practices, GMP). Es por ello que en este trabajo se pretendió estandarizar el aislamiento, caracterización y el almacenamiento de estas células, lo que permitirá su utilización en protocolos clínicos para regeneración de tejidos.

4. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Estandarizar una metodología para la obtención de células madre mesenquimales de tejido adiposo y estudiar su potencial de diferenciación mediante la realización de ensayos preclínicos “*in vitro*”, con fines de posibles aplicaciones en la terapia celular regenerativa.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- Aislar y cultivar células madres mesenquimales provenientes de tejido adiposo de donantes voluntarios sanos.
- Caracterizar fenotípicamente las células madre mesenquimales de tejido adiposo por citometría de flujo.
- Inducir diferenciación “*in vitro*” de las células madre mesenquimales de tejido adiposo a linajes osteogénicos, condrogénicos y adipogénicos.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1) Reactivos. Anticuerpos monoclonales murinos, dirigidos contra antígenos de diferenciación humanos (CD34, CD45, CD14, CD90, CD73, CD29, CD49b, CD166, CD19, CD105, CD31, KDR, HLA-DR, NESTIN, OSTEOCALCIN), conjugados a isotiocianato de fluoresceína (FITC) o Ficoeritrina (PE) fueron adquiridas en BD Biosciences (USA). Medios de cultivo comerciales para diferenciación de la casa MACs Products (*NonHematophoyetics Differentiation Medium Osteogenic, Adipogenic, Chondrogenic*), Medio de cultivo de mantenimiento α -MEM (*Minimum Essential Medium*, Sigma-Aldrich Products™) medio chan B® y medio chang C® (Irvine Scientific, USA). Enzima Colagenasa I (1,0 FALGPA U/mg) de *Clostridium histolyticum* de Sigma-Aldrich Products™, enzima similar a la tripsina de Gibco® TrypLE™ Express (USA).

5.2) Pacientes.

Bioética.

El presente proyecto fue aprobado por el comité de Bioética de la Clínica la Floresta de Caracas. Fueron incluidos en el estudio cuatro pacientes sanos previo consentimiento informado con diferentes edades y sexo (se anexa la carta de aprobación y el consentimiento informado). Los pacientes no recibieron ningún aporte económico por participar en este estudio.

Criterios de inclusión y exclusión de los pacientes

Entre los criterios de inclusión, solo fueron incluidos pacientes mayores de 18 años de edad, en un perfil de salud sano, esto implica que no hayan presentado ninguna infección y/o enfermedad. Los pacientes clasificados que se realizaron una liposucción tumescente y voluntariamente firmaron el consentimiento informado bajo sus facultades mentales.

5.3) Aislamiento y cultivo de células madre mesenquimales obtenidas a partir de tejido adiposo.

Operación y traslado de la muestra del remanente de liposucción

Luego de suscribir un consentimiento informado, en la clínica la Floresta el cirujano plástico tomo la muestra de tejido adiposo de pacientes sometidos a liposucción por técnica tumescente, tras la infiltración de una cantidad variable de solución vasoconstrictora, constituida por solución fisiológica con adrenalina a una concentración de 1:1000 (1 ampolla de Sulfato de Adrenalina por cada 1000 mL de solución fisiológica) con la finalidad de lograr hemostasis (controlar la pérdida de sangre) local y facilitar la extracción del tejido graso, minimizando la contaminación de la muestra con elementos que conforman la sangre. La solución fue infiltrada en una relación de 1 a 1 en relación con el tejido a ser aspirado o hasta que el tejido mostrara signos de tumescencia. Las muestras fueron obtenidas por aspiración, con cánulas de 4 mm de diámetro, y recolectadas directamente en Inyectadoras tipo Luer-Lok de 60 mL o en un reservorio estéril,

luego trasvasadas en forma estéril dentro del área quirúrgica a un tubo de centrifuga de 50 mL que contenía medio de transporte (compuesto por 10 mL medio alfa-MEM y 10 % SFB). Las muestras fueron transportadas para su procesamiento al IVIC en un cava a una temperatura entre 2 a 8°C, así como los 50 mL de sangre (colocados en tubos sin autocoagulante) para la obtención del suero, necesario para el cultivo de CMM-TA. En un intervalo no mayor de 4 horas se realizó el transporte hasta la Unidad de Terapia Celular del IVIC.

Procedimiento para el aislamiento de células madre mesenquimales de tejido adiposo.

Una vez en el laboratorio, se realizaron dos lavados consecutivos con PBS 1X estéril. El primer lavado se realizó completando con ésta solución el tubo de 50 mL que contenía la muestra de grasa, centrifugando a una velocidad de 600 xg aproximadamente por 10 min. y sin freno, se descartó la fase líquida y se trasvaso a un nuevo tubo de 50 mL la fase lipídica, se realizó un nuevo lavado con PBS y la fracción lipídica obtenida se sometió a digestión con la enzima Colagenasa I de *Clostridium histolyticum* a una concentración de 0,075% durante 1 hora a 37°C con agitación constante (aprox. 95 xg), al finalizar se neutralizó la digestión con medio α -MEM + 10% de SFB; se filtró la suspensión celular con un filtro de nylon de 100 μ n, luego fue centrifugada a 450 xg por 10 min. con freno para obtener el botón celular conocido como la fracción vascular del estroma (SVF), se resuspendió en 5 mL de medio nutritivo (α -MEM, 20 % SBF) y se realizó conteo celular mediante la tinción con cristal violeta.

La suspensión celular fue sembrada en frascos de cultivo T-75 (BD FALCON™T-75) en medio α -MEM-Chang (Irvine Scientific, USA) enriquecido con 20 % de suero fetal bovino (SFB), 1 % antibiótico/antimicótico y 1 % de L-Glutamina. Estas células fueron mantenidas en cultivo en un ambiente controlado en incubadora a 37 °C y 5 % CO₂. Después de 72 horas, se eliminaron las células no adherentes y se adicionó medio de cultivo basal fresco (alfa-MEM-Chang/ 20 % de SFB, 1 % Antibiótico antimicótico y 1 % de L-Glutamina). Las CMM-TA fueron aisladas por su capacidad de adherencia al plástico. Se realizaron recambios de medio de cultivo hasta alcanzar una confluencia cercana al 70-80 %. Las CMM-TA fueron expandidas mediante repique de los cultivos.

Cultivo primario de las células madre mesenquimales de tejido adiposo

La morfología, adherencia y proliferación celular se determinó mediante microscopía de luz. El mantenimiento y expansión del cultivo una vez alcanzada una alta confluencia se realizó despegándolas células adheridas al plástico por medio de enzimas peptidasas que separan los enlaces entre el plástico y las moléculas de adhesión, para ello se utilizó un reactivo similar a la tripsina conocido como TrypLE Express™ de Gibco®, se añadió 2,5 mL y 6,5 mL a los frascos de T-25 y T-75, respectivamente, se incubó por 6 min. en la incubadora, Una vez despegadas las células se centrifugaron a 450 xg por 10 min. para formar el taco celular, el cual fue resuspendido en 1 mL de medio basal para neutralizar la acción de la enzima, se realizó un conteo celular y determinación de la viabilidad por medio de la tinción con azul de tripano en la cámara de Neubauer.

Se sembraron en frasco de cultivo flask T-75, T-175 o T-25 (BD, USA) con una proporción de 150.000 células/cm² para realizar pasajes consecutivos desde el pasaje 0 hasta el 3.

Mantenimiento del cultivo y tripsinización.

Las células madre derivadas de tejido adiposo se cultivaron en placas de plástico BD FALCON a una densidad aproximada de 10.000 células/cm² y se mantuvieron en cultivo a 37 ° C y 5% de CO² en incubadora, realizando cambios de medio 2 veces por semana, hasta alcanzar un máximo de confluencia del 90%.

Cuando las células llegaron a cubrir casi la totalidad de la superficie de la placa (>80% confluencia) se despegaron por tripsinización para realizar el repique de cultivo.

Contaje y viabilidad celular.

Para contar las células viables en una suspensión celular se utilizó el método de exclusión del azul tripano. Para ello, se mezclaron 10 µL de la suspensión celular con 10 µL de una solución de colorante vital azul tripano al 0,4 % en PBS (Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Tras mezclarlo bien se cargó 10 µL de dicha dilución en una cámara de Neubauer y se procedió a contar las células en el microscopio. Se consideraron células viables aquellas que presentasen un perímetro más o menos circular, con borde regular y sin tinción azul.

La cámara de Neubauer es utilizada para el recuento celular en medio líquido. En base a la cantidad de células contadas y según el volumen de líquido que admite la cámara, se puede calcular la concentración de células por unidad de volumen en la muestra inicial, la cual viene dada por la siguiente fórmula simplificada:

$$\text{Concentración (células/mL)} = M \times \text{dilución} \times 10.000$$

Donde M es la media de las células contadas por cuadrado grande (compuesto por 16 cuadrados más pequeños) de la cámara de recuento. La dilución se toma siempre como 2, ya que la relación en la mezcla entre suspensión celular y azul tripano es 1:1, el número 10.000 representa la ampliación del microscopio.

5.4) Congelación de células madre mesenquimales del tejido adiposo

Para mantener los pasajes y asegurar que siempre hubiera un respaldo de células con las cuales trabajar para la caracterización se realizó la congelación de las CMM de tejido adiposo por cada paciente en todos los pasajes de cultivo realizados.

Para congelar un número determinado de células, después de haber realizado la tripsinización y conteo celular, se centrifugó la suspensión celular a 450 xg durante 5 min. y luego de eliminar el sobrenadante se resuspendió el taco celular previamente colocado en frío en un volumen conocido de medio de congelación frío para obtener una concentración determinada de células (normalmente

0,5x10⁶ - 1x10⁶ células por mL de medio de congelación), esta suspensión fue almacenada en crioviales de 2 mL (TPP, Trasadingen, Suiza) y se introdujeron rápidamente en una nevera a -20 °C por una hora, finalmente se pasan a un congelador de -70 °C por 24 horas, tras este período de tiempo los crioviales se guardaron en una caja dentro de un tanque con nitrógeno líquido para su conservación a -196 °C hasta su utilización. El medio de congelación se compone de un 10 % medio de cultivo basal suplementado con un 80 % de suero fetal bovino y 10 % de DMSO (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania).

5.5) Caracterización fenotípica células madre mesenquimales del tejido adiposo

Las CMM derivadas del tejido adiposo por liposucción fueron evaluadas por citometría de flujo que funciona como técnica inmunoespecífica donde se marcan anticuerpos por fluorocromos que reaccionan específicamente con moléculas en la superficie de la célula que son características de la misma, estas señales emitidas se digitalizan por medio del citómetro y se realizan los análisis del marcaje por medio de histogramas. Se midió la expresión de los siguientes marcadores de superficie: marcadores de célula madre mesenquimal (CD90, CD73, CD105, CD29, CD166 y CD49b) y marcadores hematopoyéticos (CD34, CD45 y CD14). Todos estos anticuerpos estaban conjugados a ficoeritrina (PE) o a isotiocianato de fluoresceína (FITC) y fueron adquiridos al citómetro Becton Dickinson (San Diego, USA). . Las células se cultivaron y fueron colectadas mediante tripsinización (ver metodología de cultivo celular

apartado 5.3, parte 3), una vez contadas (ver metodología de conteo y viabilidad celular apartado 5.3, parte 3 párrafo 3), se utilizaron 60.000 células para cada marcaje realizado, estas células se colocaron en un volumen de 50 μ L de PBS/ albúmina sérica bovina (BSA) al 0,1 % en un vial de 1,5 mL. Se utilizaron los siguientes anticuerpos monoclonales (conjugados a FITC o PE) de ratón dirigidos contra los siguientes marcadores humanos: CD34, CD45, CD31, KDR, CD90, CD73, CD105, HLA-DR, CD29, CD19, CD166 y CD49b (ver lista de abreviaturas). Cada vial con sus respectivos anticuerpos fueron incubados 20 min. en frío, protegido de la luz. Posteriormente, cada vial se lavo con 1 mL de PBS/BSA, se centrifugó a 450 xg por 8 min. y se resuspendió en 300 μ L de PBS/BSA 0.1%. Como control negativo se incubó a las CMM-TA con los respectivos isotipos (IgG1 e IgG2a conjugados a PE o FITC, respectivamente) por 20 min. en frío y oscuridad. La lectura se realizó en un citómetro de flujo FACScalibur (Becton-Dickinson), mediante la adquisición de cinco mil eventos (aproximadamente) por tubo y el análisis de expresión fue realizado mediante la obtención de histogramas, utilizando el programa CELLQuest (BectonDickinson, USA).

5.6) Diferenciación de las células madre mesenquimales del tejido adiposo.

La capacidad multipotencial de las CMM fue examinada mediante el cultivo de estas células en medios de diferenciación osteogénico, condrogénico y adipogénico y comprobada mediante las tinciones histológicas correspondiente

para cada linaje. La tabla 3 se muestran los factores y suplementos que cada medio de diferenciación específico.

Tabla 2. Posibles diferenciaciones de CMM-TA hacia tres linajes mesenquimales señalando los distintos suplementos añadidos al medio de cultivo de diferenciación “*in vitro*”.

Linaje celular	Suplementos destacados	Referencias
Osteogénico	ácido ascórbico, β -glicerofosfato, dexametasona/vitaminaD	Zuk, 2001 Halvorsen, 2001
Adipogénico	Indometacina, IBMX, dexametasona, insulina	Zuk, 2001
Condrogénico	Insulina, ácido ascórbico, TGF β 1, transferrina	Huang, 2004

Brevemente, las CMM-TA fueron despegadas por tripsinización de los frascos de cultivo y sembradas en placas de cultivo de 24 pozos a una densidad celular de 4×10^4 células por pozo en medio de cultivo basal hasta que alcanzó aproximadamente un 60 % de confluencia, en ese momento se retiró el medio y se sustituyó por el medio de diferenciación correspondiente. Como control negativo de la diferenciación se mantuvieron pozos en medio basal.

Cultivo de células madre mesenquimales de tejido adiposo en medio de inducción osteogénico

La diferenciación osteogénica se realizó según el protocolo de Jaiswal y colaboradores de 1997. Para ello, como se mencionó anteriormente se sembraron 40.000 células en replicas en placas de 24 pozos y se mantuvieron en cultivo hasta que alcanzaron el 60 % de confluencia. Una vez confluentes se inició la diferenciación, cambiando el medio de cultivo de mantenimiento por medio de cultivo inductor, comercial *NonHematophoyetics Diffetiation Medium Osteogenic* (MACs) (y no comercial, compuesto por medio de cultivo basal suplementado con los siguientes factores: 1,8 mM de ácido ascórbico-2-fosfato de Merck, 2 mM de β -glicerofosfato de Sigma-Aldrich, USA y 100nM de dexametasona de Biotech. El cultivo se mantuvo hasta los 14 días con cambios de medio cada 7 días. Finalizado el protocolo de diferenciación se pudo comprobarla inducción osteogénica mediante coloración con rojo de alizarina.

Cultivo de células madre mesenquimales de tejido adiposo en medio de inducción condrogénico

La diferenciación condrogénica se realizó según el protocolo de Zuk y col., de 2001 para el cultivo en forma de micromasa. Para ello, las células se sembraron en una concentración de 80.000 células/10 μ L de medio de mantenimiento/pozo con replicas en placas de 24 pozos, se incubaron por 2 horas

a 37 °C y 5 % de CO² y luego de estar adheridas se añadió el medio de diferenciación condrogénica comercial (*Cell Application, USA*) que contiene los factores Insulina, ácido ascórbico, TGFβ1 y transferrina; se realizaron cambios semanales del medio. Se mantuvieron en cultivo hasta que alcanzaron confluencia y la masa creció hacia los alrededores de la placa, aproximadamente por 28 días. Finalizado el protocolo de diferenciación se pudo comprobar la inducción condrogénica por medio de la tinción azul de alciano.

Cultivo de células madre mesenquimales de tejido adiposo en medio de inducción adipogénico

La diferenciación adipogénica se realizó según el protocolo de Pittenger y colaboradores en 1998. De la misma forma que la inducción en medio osteogénico, el protocolo no se inició hasta que las células no alcanzaron el 60% de confluencia en medio de mantenimiento. Una vez confluentes se añadió el medio de cultivo inductor de adipogénesis comercial (NH Adipodiff Human) que contiene 1 μM de dexametasona, 0,5 mM de isobutil-metilxantina (IBMX), 10 μg/mL de insulina y 100 μM de indometacina (Miltenyi, USA). Las células se mantuvieron en cultivo por 14 días con cambios de medio cada 7 días. Una vez finalizado el protocolo se pudo analizar la inducción adipogénica mediante tinción con *Aceite Rojo*.

Fijación de las células madre mesenquimales de tejido adiposo inducidas hacia linajes osteogénicos, condrogénicos y adipogénicos *in vitro*.

Para evidenciar los cambios asociados al proceso de diferenciación, se fijaron las células utilizando paraformaldehído (PFA) (Merck, USA). Para ello primero se retiró el medio de diferenciación, se realizaron dos lavados con PBS y se añadió PFA al 4 % a los pozos con diferenciación condrogénica y osteogénica durante 10 min.; o PFA al 10 % por 15 min. a los pozos con diferenciación adipogénica. Al finalizar la fijación se realizaron dos lavados con PBS 1X y se procedió con las tinciones histológicas.

5.7) Identificación de la inducción hacia linajes osteogénicos, condrogénicos y adipogénicos por medio de tinciones celulares.

Se realizaron tinciones específicas para cada caso. Brevemente, rojo de alizarina para detectar deposición de calcio (evidencia de osteogénesis), azul alcian para detectar proteoglicanos (evidencia de condrogénesis) y aceite rojo (*Oil Red*) para detectar lípidos (evidencia de adipogénesis). En todos los casos se realizó observación microscópica y registro fotográfico.

Tinción con rojo de Alizarina

Luego de la fijación con PFA, la tinción con rojo de alizarina se utilizó para evaluar los depósitos minerales ricos en calcio durante los procesos de osteogénesis en cultivos derivados de células CMM-TA.

Se añadió 500 μ L/pozo del reactivo rojo de alizarina por 30-60 segundos a temperatura ambiente hasta la aparición de un precipitado rojo que indicará la presencia de depósitos de fosfatos de calcio. Luego se realizó tres lavados con agua destilada y se observó al microscopio óptico (Zuk y col., 2001). La preparación del reactivo del rojo de alizarina esta en el apéndice 1.2.

Tinción con aceite rojo.

La tinción con aceite rojo se utilizó para identificar los depósitos de lípidos citoplasmáticos en cultivos derivados de células CMM-TA que aparecen durante el protocolo de adipogénesis. Luego de la fijación con PFA, se retiró el PBS del último lavado de PFA y se añadió 500 μ L de isopropanol al 60% por 5 min. se retiró el isopropanol y sin lavar, se añadió 500 μ L de la solución de aceite rojo y se incubó a temperatura ambiente por 10 minutos. Posteriormente, se realizaron de 2-3 lavados suavemente con 500 μ l de agua desionizada. Se adicionó 500 μ L de agua desionizada a cada pozo y se observó al microscopio óptico. (Burckhardt, 1995). La preparación del reactivo del aceite rojo y la solución de trabajo del aceite rojo está en el apéndice 2.

Tinción azul de alcian

La tinción azul de alcian se utilizó para identificar los mucopolisacáridos ácidos en los cultivos de CMM-TA que aparecen durante el protocolo de condrogénesis. (Scott y Stevenson, 1964). Luego de la fijación con el PFA, se añadió 0,5 mL del colorante azul de alcian (1% de azul de alcian 8GX y 3% de ácido acético glacial, ajustado con pH al 2,5) por 30 minutos y una vez que transcurrió este tiempo se realizó un lavado con agua destilada y se observó al microscopio. La preparación del reactivo del azul de alcian está en el apéndice 2.

6. RESULTADOS

6.1) Aislamiento de células madre mesenquimales a partir de tejido adiposo de pacientes sometidos a liposucción.

Distribución de pacientes y cantidad de muestra

Fueron procesadas tres muestras provenientes de pacientes femeninos y una muestra de paciente masculino, que donaron voluntariamente el remanente obtenido luego del procedimiento de liposucción que fue realizado por el Dr. Rubén Contreras en la Clínica La Floresta. En la tabla 3, se resume la cantidad de pacientes y la cantidad de muestra de grasa que se obtuvo de cada uno expresada en gramos; la cantidad de tejido adiposo se calculó tomando como peso inicial (Pi) el tubo con el medio de transporte y como peso final (Pf) el tubo que contenía el medio de transporte con la muestra de grasa, dando la siguiente fórmula: $[Pm: Pf - Pi]$, obteniendo así la cantidad en gramos del remanente de la liposucción para procesar

Tabla 3. Distribución de los pacientes según sexo y cantidad de muestra en gramos.

Paciente	Sexo	Cantidad de muestra (g)
1	Femenino	47.4
2	Femenino	73
3*	Femenino	64
		33.3
4	Masculino	13

* En el paciente 3 se tomaron dos muestras una de 64 g que fue procesada el día que fue tomada y otra de 33,3 g que fue procesada luego de haber sido refrigerada a 4° C por 24 horas para determinar si es factible procesar las muestras el día siguiente de la toma.

En la tabla 4, se resume la cantidad de células totales obtenidas por cantidad de muestra, fueron procesadas en orden y la cantidad total de células corresponde al conteo de la fracción vascular estromal (FVS) que se obtiene luego de la digestión enzimática. El contaje se realizó por medio de la cámara de Neubauer con la tinción de cristal violeta, permitiendo así, contar solo las células nucleadas y no los eritrocitos que permanecen presentes en la muestra.

Tabla 4. Muestras procesadas y cantidad de células totales obtenidas desde el aislamiento del tejido adiposo.

MUESTRA	Peso de muestra (g)	Células totales obtenidas (FVS)	Rendimiento del aislamiento (células/g)
1	47,4	16.000.000	337.552,74
2	73	40.000.000	547.945,21
3	64	38.000.000	593.750,00
	33.3	17.250.000	518.018,02
4	13	4.500.000	346.153,85
Promedio	46.1	23.150.000	502.169,20 ±10.634

Con la cantidad en gramos obtenidos por paciente y las células obtenidas de cada paciente se realizó una aproximación matemática, la cual permitió la establecer una relación de la cantidad de células totales que se puedan obtener a partir del peso de la muestra a través de una extrapolación, así como también la cantidad mínima requerida para obtener un buen rendimiento.

Al relacionar las células totales obtenidas con la masa del tejido adiposo procesada. Se obtuvo una correlación lineal ($y = 1E+07x - 9,5E+06$; $R^2 = 0,926$) (figura 5) permitiendo así, estimar la cantidad de células de las FVS presentes en una cantidad de gramos por la muestra de liposucción. Además obtener el rendimiento teórico de la células aisladas luego del procesar una masa con un

peso conocido de tejido adiposo, correspondiente a 500.000 células totales por gramo a mayor cantidad de muestra mayor es la cantidad de células obtenidas.

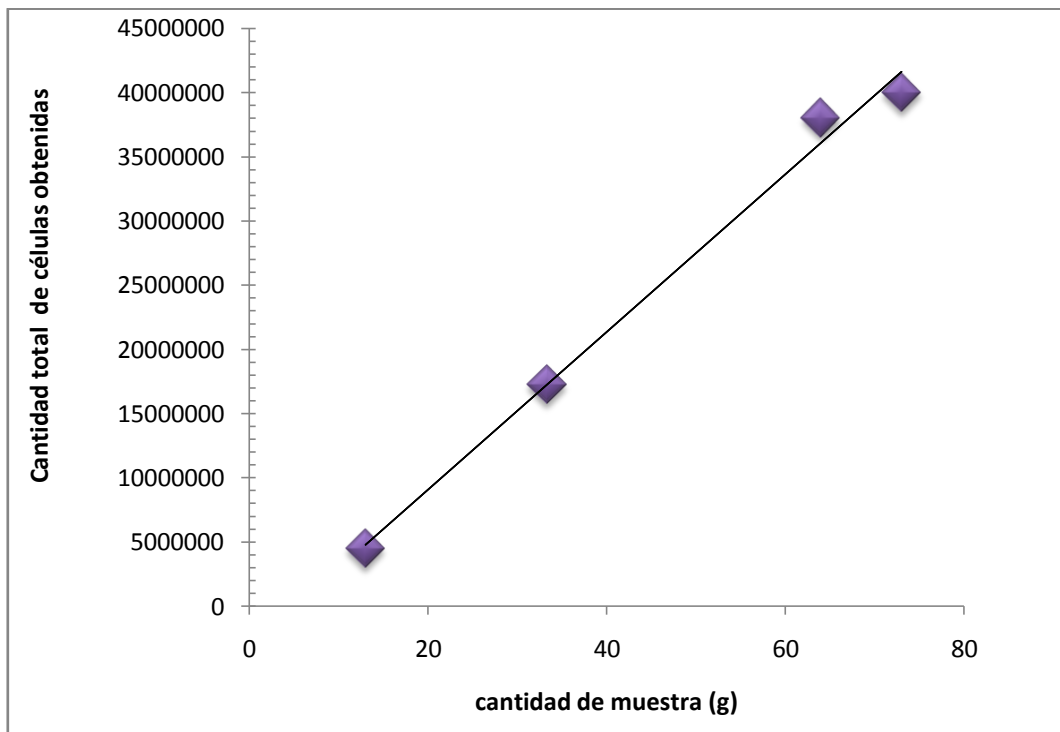


Figura 5. Relación lineal de la cantidad de células totales obtenidas por masa de la muestra de grasa procesada ($y = 1E+07x - 9,5E+06$; $R^2 = 0,926$).

Demostrando que el rendimiento teórico y el experimental producto del promedio de las muestras procesadas son similares, de estos resultados se puede estimar un rango de la cantidad de CMM por gramo, correspondiente de 1 a 5 % de la cantidad total de células, se encuentran aproximadamente de 5.000 a 25.000 CMM por gramo de tejido adiposo procesado.

Establecimiento de cultivos primarios de la fracción vascular-estromal del tejido adiposo

Para el aislamiento de las FVS a partir de las muestras procesadas mediante la digestión enzimática con colagenasa I, se utilizó la primera muestra de 47,4 g esta se evaluó a diferentes tiempos de incubación, el mejor resultado se obtuvo a los 60 min. de digestión con agitación constante, este tiempo fue utilizado en el aislamiento de las FVS para todas las muestras.

Una vez contadas las células en la FVS obtenida, se sembraron en una proporción de 100.000 células por cm^2 en frascos de cultivo T-75 y/o T-175, de esta forma se establecieron los cultivos primarios (figura 6); se observaron al microscopio de luz diariamente, se realizó registro fotográfico y fueron retiradas las células no-adherentes a las 72 horas, realizando varios lavados con PBS para ir eliminando las células que no tenían capacidad de adhesión al plástico y los glóbulos rojos. Se determinó el crecimiento del cultivo primario evaluando la confluencia en el tiempo.

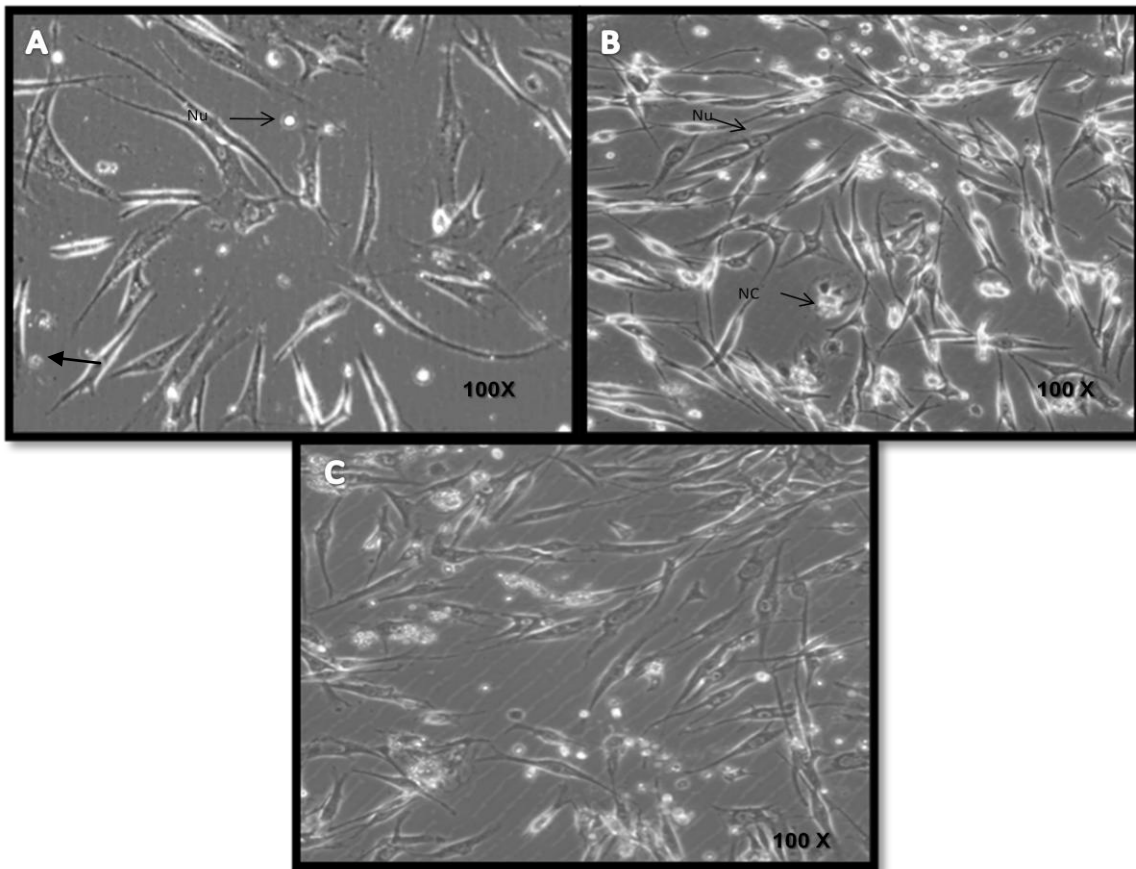


Figura 6. Comparación del cultivo primario de las células madre mesenquimales de tejido adiposo a las diferentes horas luego del aislamiento por digestión enzimática. A: Cultivo a las 24 horas después del aislamiento. B: Cultivo a las 72 horas después del aislamiento C: Cultivo a las 96 horas después del aislamiento. Microscopía de luz. Aumento 100X. Se observan detalles de la morfología como el núcleo (Nu) pequeño y ovalado, como un núcleo redondo y con múltiples nucléolos (NC).

En la figura 6 se observan los cambios en la secuencia de los cultivos primarios dependientes del tiempo. Todas las células adheridas presentaron morfología tipo alargada, con la presencia de un núcleo alargado y algunas presentan extensiones citoplasmáticas, pero también se observan algunas células con morfología redonda u ovalada (flecha negra, figura 6A). El cultivo primario a las 24 horas se caracterizó por tener poca cantidad de células adherentes y muchas células en el sobrenadante que correspondían a los glóbulos rojos, la distribución de estas

células adherentes eran aisladas y poco confluentes. El cultivo primario a las 72 horas luego de retirar las células no adherentes se caracterizó por tener gran cantidad de células adherentes y se comienza a observar que las células están agrupadas y distribuidas regularmente comenzando a formar un estroma celular en forma de monocapa (figura 6B) presentaron morfología fibroblastoide con forma ahusada, con múltiples nucléolos y con prolongaciones citoplasmáticas. Finalmente el cultivo primario a las 96 horas mostró células con morfología típica fibroblastoide (figura 6C), y alargadas con muchas ramificaciones citoplasmáticas.

Desde la primera etapa del cultivo estas células proliferaron rápidamente en las condiciones “*in vitro*” establecidas, llegando hasta el décimo pasaje sin mostrar diferencias en la morfología, ni cambios asociados a la senescencia, los pasajes se realizaron despegando las células al llegar a un 80-90 %. La caracterización completa se realizó hasta el 3er pasaje.

En la Figura 7 se presentan las células a diferentes tiempos a lo largo del cultivo, estas células mostraron una rápida proliferación hasta formar una monocapa estructurada y confluyente. Las fotografías fueron tomadas con un microscopio de luz, con un aumento de 100X. La Figura 7B muestra cuando las células alcanzan una alta confluencia, se puede observar una población celular más homogénea y ordenada con morfología fibroblastoide típica, desde de este confluencia se realizó subcultivos de las CMM-TA. Se esperó que creciera hasta el máximo de la confluencia solo para probar la viabilidad de los cultivos. Los medios de

mantenimiento se cambiaron cada 3 a 4 días para el establecimiento de los cultivos.

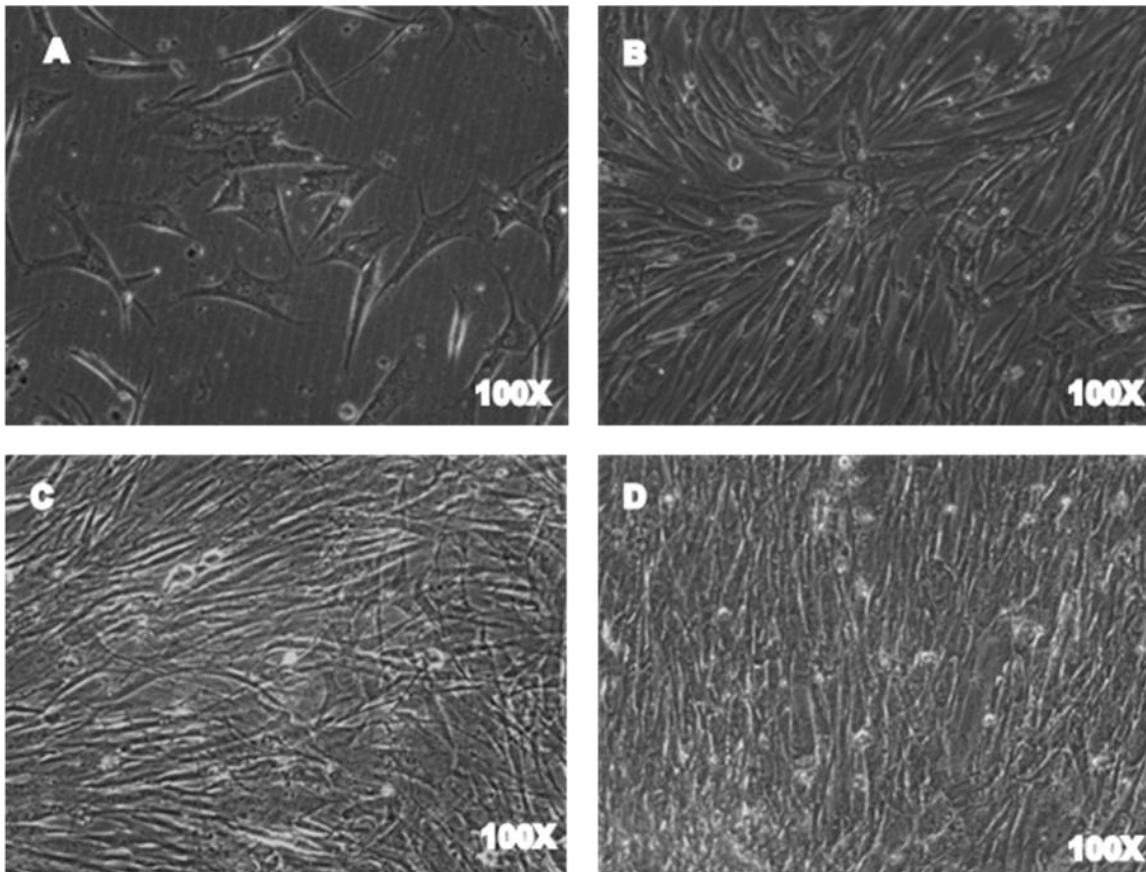


Figura 7. Cambios en morfología y confluencia del cultivo de las CMM provenientes de tejido adiposo dependiente del tiempo. A: Cultivo primario a los 3 días. B: Cultivo a los 4 días. C: Cultivo a los 6 días. D: cultivo a los 8 días. Se observa que a medida que incrementa la confluencia las células forman una monocapa con células fusiformes.

Para establecer los pasajes se sembraron en una relación de 10.000 células/cm² por frasco de cultivo flask T-25 o T-75, como requerimiento mínimo para garantizar su proliferación y así mantener el cultivo hasta el pasaje 3.

Para estudiar la estabilidad del tejido graso en el tiempo, se utilizo la muestra obtenida del paciente 3 (tabla 3), a este paciente se le tomaron dos muestras una

con 64 g que se proceso el mismo día y otra de 33,3 g que permaneció a 4 °C por 24 horas. Al realizar el aislamiento de la FVS en esta última, se observó la morfología y proliferación de las células y se comparo con las células procesadas el mismo día.

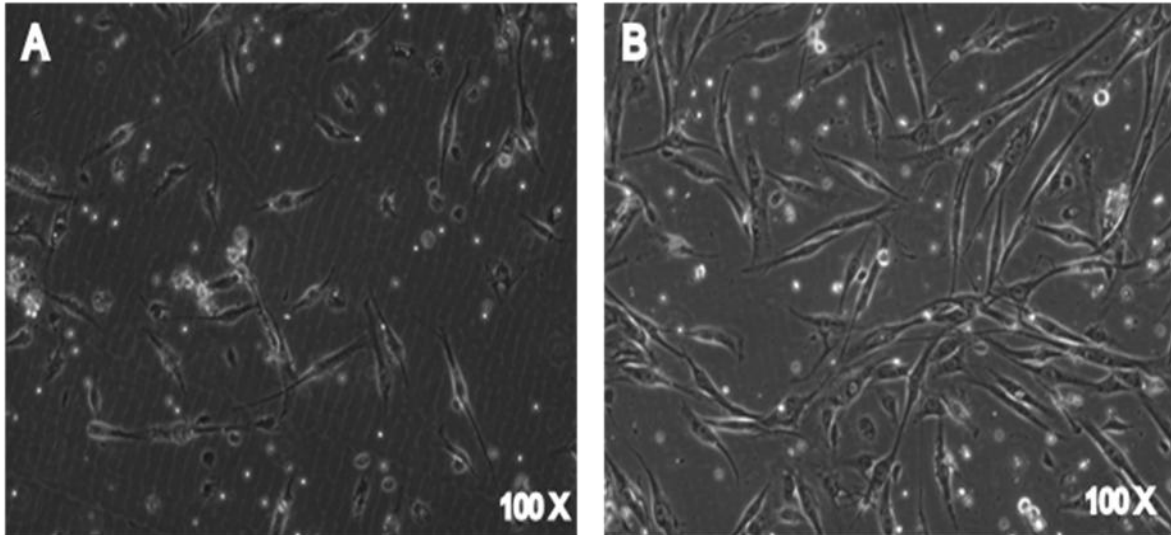


Figura 8. Comparación morfológica a las 72 horas de cultivo de las células madre mesenquimales provenientes del tejido adiposo entre células refrigeradas a 4 °C por 24 horas y las células procesadas el mismo día. A: Cultivo primario de CMM de tejido adiposo refrigerado por 24 horas. B: Cultivo de CMM de tejido adiposo primario procesadas el mismo día. Microscopia de luz 100 X de aumento.

En la figura 8 se observa como la proliferación celular a las 72 horas, partiendo desde el mismo número de células, es menor la cantidad de células en la muestra refrigeradas por 24 horas (figura 8A) en comparación a las células aisladas el mismo día (figura 8B); la morfología celular también parece haberse afectado por el proceso de refrigeración ya que se observan las células con menor cantidad de prolongaciones y menor tamaño.

6.2) Identificación de los marcadores de superficie expresados en las Células Madre Mesenquimales derivadas de tejido adiposo por medio de citometría de flujo.

Una vez establecidos los cultivos y la expansión de los mismos, se realizó la caracterización por medio del inmunofenotipaje de las células obtenidas desde el día de su aislamiento (FVS) hasta el tercer pasaje.

Por medio de la citometría de flujo, fue posible determinar la expresión fenotípica (tabla 1) de la células en su superficie, los anticuerpos conjugados a flourocromos son específicos para las células y al ser reconocidos en la superficie de las CMM-TA son capaces de emitir una señal de fluorescencia que es decodificada por el citómetro y se puede cuantificar su magnitud de expresión asociando una relación entre las células que expresaron el anticuerpo con el nivel de fluorescencia emitido en la figura 10 se muestra un ejemplo de cómo se cuantifica el marcaje de las células.

Se muestran los resultados promediados de la expresión en porcentaje de cada uno de los marcadores moleculares determinados en cada pasaje analizados por citometría de flujo. Se observa que cada marcador varía su expresión a medida que pasa el tiempo de cultivo (figura 9).

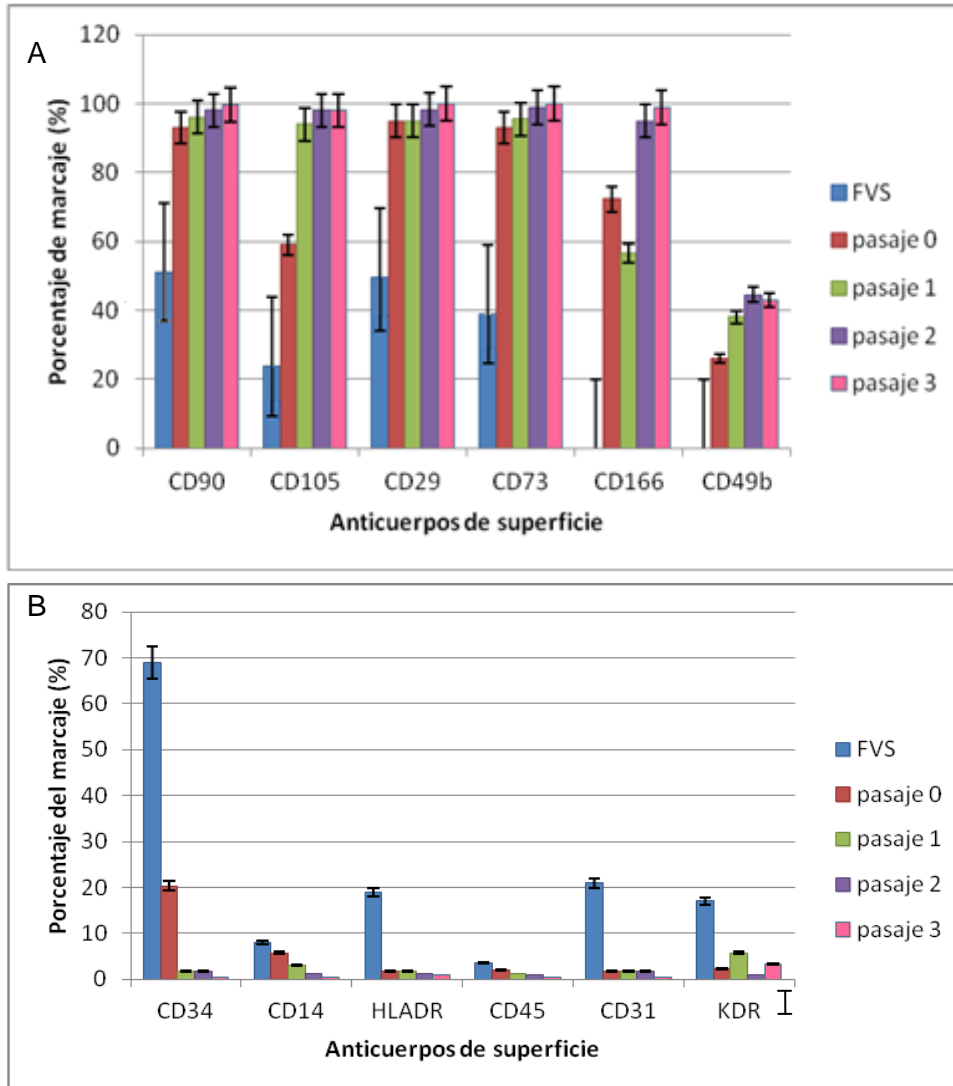


Figura 9. Comparación del inmunofenotipo de las células madre mesenquimales de tejido adiposo en el transcurso del cultivo. Se muestra la expresión de marcadores moleculares analizados por citometría de flujo con el promedio de todas las 4 muestras procesadas \pm el error típico (I). El conjunto de marcadores que se presenta en la figura indican características que en conjunto posee las células madre mesenquimales. A: Expresión de los anticuerpos positivos para células madre mesenquimales B: Expresión de los anticuerpos negativos para células madre mesenquimales. Se muestra el % de expresión de los promedios de los marcadores moleculares para cada pasaje de cultivo, desde el día del aislamiento hasta el 3er pasaje del promedio de las muestras analizadas mediante citometría de flujo.

Se puede observar que los marcadores típicos de CMM como CD90, CD73, CD29, CD105, se expresan desde la FVS, el porcentaje de células positivas incrementa con cada pasaje hasta alcanzar el 100% en el pasaje 3, otras moléculas como CD166 y CD49b, que no estaban presentes en la FVS incrementaron considerablemente a lo largo de los pasajes (figura 9A).

Por el contrario la molécula CD34, que no es característica de CMM sino marcador hematopoyético/endotelial se expresó en un alto porcentaje en la FVS, y éste disminuyó después del primer pasaje de cultivo. Por otra parte, los marcadores CD14, CD45, CD31 y HLA-DR comienzan expresándose en un bajo porcentaje en la FVS y luego desaparecen a lo largo de los pases sucesivos. Por último, el marcador endotelial KDR disminuye a partir del pasaje cero pero sin desaparecer completamente a lo largo de los pasajes de cultivo (figura 9B).

En la figura 10, se muestra un ejemplo representativo del análisis por citometría de flujo de la muestra 3 en el pasaje 3. Todos los análisis de citometría de flujo se realizaron con el programa Cell Quest® en forma de histogramas. En los histogramas el eje de las X representa la intensidad de fluorescencia de cada parámetro evaluado y en el eje de las Y representa el número de células.

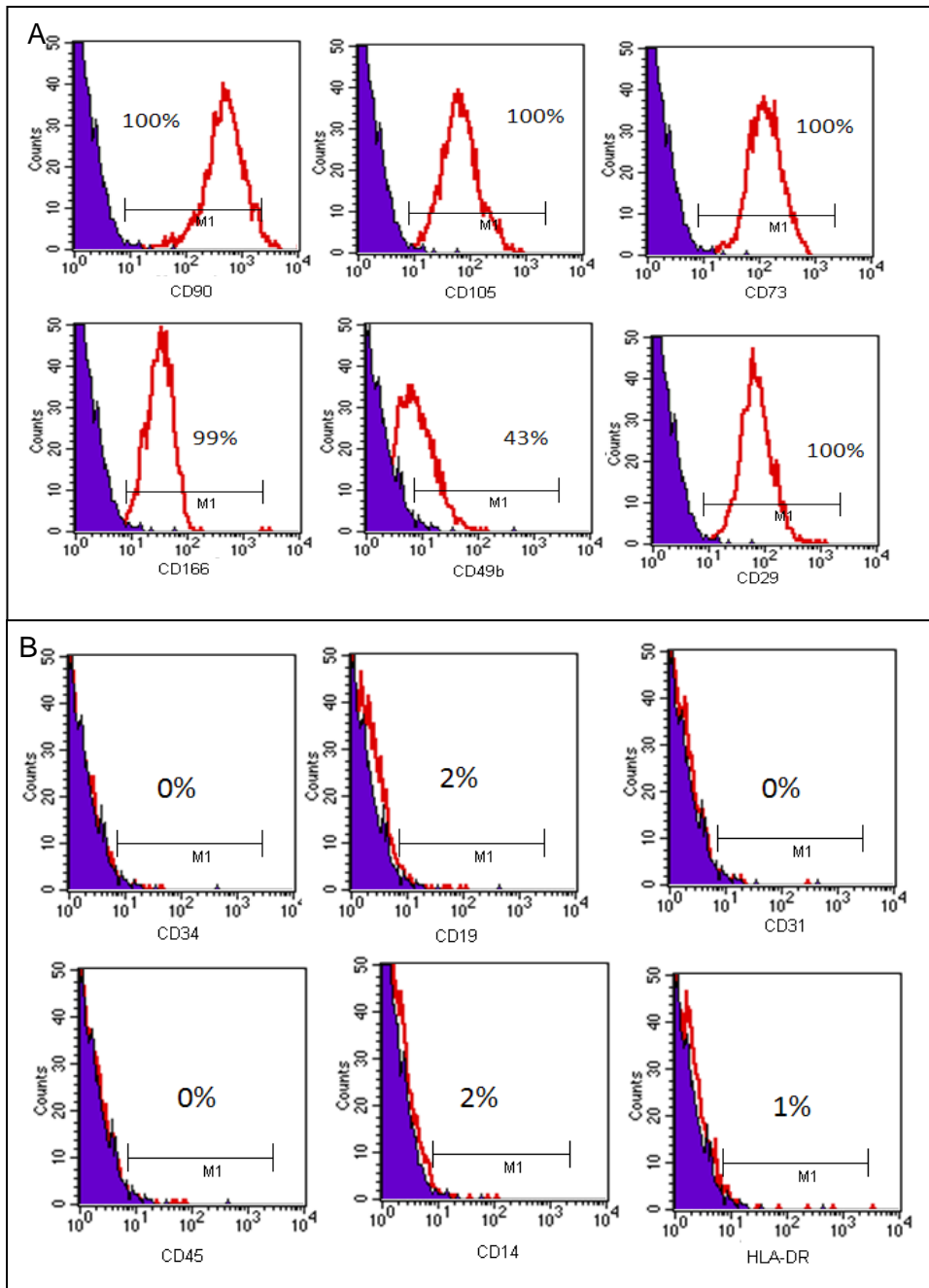


Figura 10. Análisis representativo de la citometría de flujo realizada sobre las CMM-TA. Análisis de la citometría representado por Histogramas obtenidos del pasaje 3, muestra 3. A: Marcajes positivos para los marcadores CD90, CD73, CD105, CD166, CD49b y CD29. B: Marcajes negativos para los marcadores CD45, CD31, CD14, CD34, CD19 y HLA-DR. Las curvas en color rojo muestran la distribución de la molécula determinada y en color morado el control negativo conocido como isotipo.

Sobre la base establecida por la ISTC, para los marcadores de membrana celular presentes en una CMM, podemos determinar que las células obtenidas a partir del pasaje 2 (figura 9) de todos los pacientes analizados corresponden a CMM derivadas de tejido adiposo altamente seleccionada ya que presentan un inmunofenotipo caracterizado por la expresión de CD90, CD105, CD73 y CD29 es un porcentaje mayor a 95% y ausencia o expresión inferior al 2% de la moléculas CD45, CD14, CD34, CD19 y HLA-DR.

6.3) Diferenciación “*in vitro*” de las células madre mesenquimales de tejido adiposo hacia linajes osteogénicos, condrogénicos y adipogénicos.

La capacidad de las CMM-TA para diferenciarse hacia linajes osteogénicos, condrogénicos y adipogénicos fue determinada a través de su inducción con medios de diferenciación específicos. Para evaluar los cambios morfológicos en los cultivos se realizaron observaciones al microscopio de luz determinando la presencia de rasgos característicos de los linajes evaluados (tabla 5).

Tabla 5. Distribución general de la inducción a diferenciación *in vitro* hacia linajes osteogénico, adipogénico y condrogénico. +++ Alta; ++ Media, + Regular

Linaje de diferenciación	Evidencia morfológica de diferenciación	Días de diferenciación “ <i>in vitro</i> ” (días)
Adipogénico	+++	14
Osteogénico	++	14
Condrogénico	+	28

La diferenciación adipogénica (figura 11) fue la más evidente a nivel de su morfología, dado que desde la primera semana las células cambiaron su morfología alargada fusiforme por una más redonda con vacuolas lipídicas citoplasmáticas, la presencia de estas gotas de lípidos fue aumentando a lo largo del cultivo.

La diferenciación osteogénica (figura 12, 13) fue menos evidente pero si se observó como la disposición de las células en la monocapa se modificaba por una con células mas delgadas y con diferente dirección simulando una red mas entramada con presencia de precipitados oscuros, esto se observó a partir de los 10 días de cultivo en el medio de diferenciación.

La diferenciación condrogénica (figura 14) no se mostros una evidencia clara en la muestra 1, por lo que se procedió a estandarizar un tipo de cultivo denominado micromasa con este sistema de cultivo se logró evidenciar la morfología típica de los condroblastos ya que se observa mas redondeada después de 28 días de cultivo.

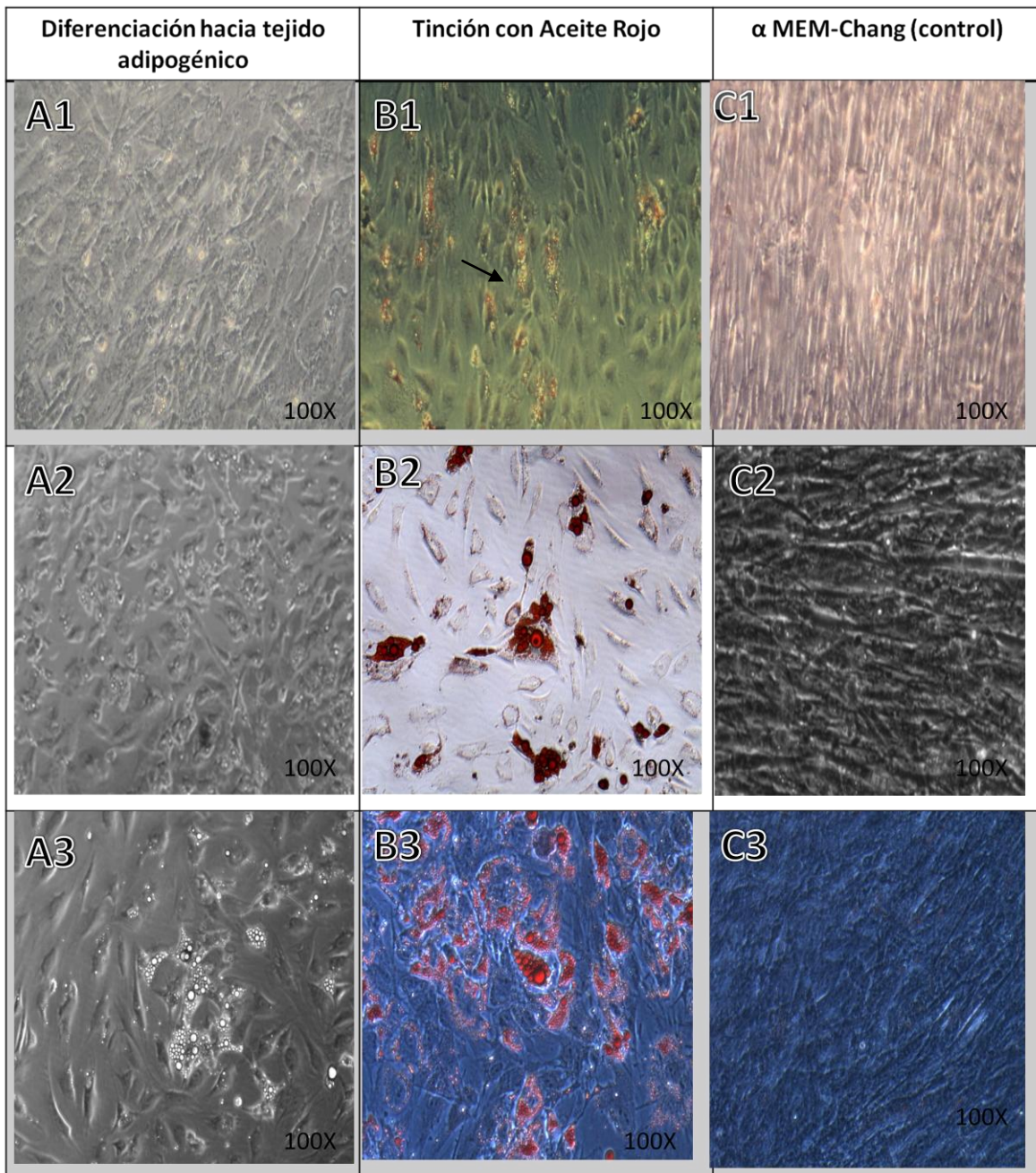


Figura 11. Diferenciación adipogénica “*in vitro*” de las muestras procesadas. Microscopio de luz, aumento 100 X. A: Diferenciación “*in vitro*” evidenciada por los cambios en la morfología; B: Tinción específica para detectar rasgos característicos de la diferenciación; C: Control sin diferenciación con medio de cultivo α -MEM chang. La numeración correspondiente 1,2 y 3 es el número muestra procesada.

Para evaluar la diferenciación adipogénica se realizó, cultivos en forma de monocapa en medio de diferenciación adipogénica y mostraron rápidamente señales de diferenciación (tabla 5), tales como pequeñas vacuolas lipídicas citoplasmáticas que incrementaban a medida que pasaban los días en cultivo (figura 11 A1, A2, A3). Se utilizó la tinción de *Aceite Rojo* para evidenciar las gotas de lípidos coloreadas en rojo (figura 11 B1, B2, B3), la metodología utilizada fue eficiente ya que se logró obtener una buena diferenciación adipogénica inducida por el medio de diferenciación. Como era de esperarse el control de células cultivadas en medio de mantenimiento conservaron su morfología típica fibroblastoide y no mostraron coloración roja en las gotas de lípidos (figura 11 C1, C2, C3).

Durante la estandarización, se estableció que para la coloración con Aceite Rojo el proceso de fijación debe ser con PFA al 10% durante 15 min., en lugar de utilizar PFA al 4 %, esto se determinó luego de la primera muestra donde se observó que con los lavados se venía parte de la monocapa y la tinción no era muy eficiente, como se observa en la en figura 11B1; al compararla con las muestras posteriores donde se evidenció una mejor coloración (Figura 11B2, B3). También se redujo el tiempo de fijación de 1 hora a 15 min. al no observarse diferencias.

Además de la diferenciación adipogénica se realizó una diferenciación *in vitro* hacia linaje osteogénico, en el cual todas las muestras fueron sometidas a estos medios de selección con los factores correspondientes (tabla 2) y una vez evidenciado los cambios morfológicos correspondientes (tabla 5) se comprobó mediante la coloración de aceite rojo.

En los cultivos mantenidos en medio de diferenciación osteogénica, se apreció la formación de nódulos celulares a partir de la segunda semana de inducción, los cuales se forman por unión de las células por continuación de la formación de la monocapa, de igual manera se observaron cambios morfológicos en las células que migraban de estos agregados, caracterizados por la pérdida de la morfología ahusada característica inicial y de menor tamaño en comparación con las células de morfología fibroblastoide de los cultivos control (figura 12).

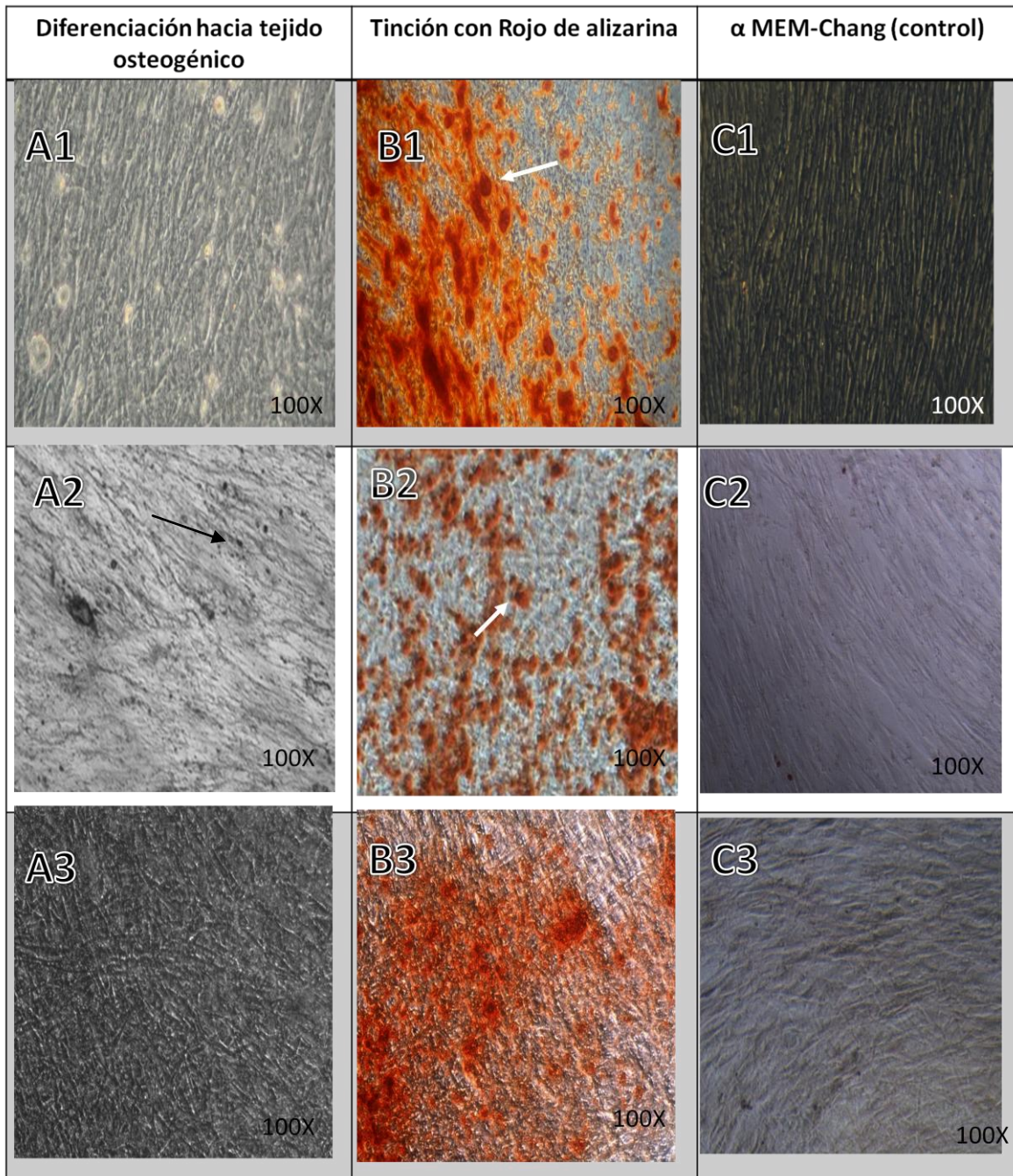


Figura 12. Diferenciación osteogénica “*in vitro*” de las muestras. Microscopio de luz, aumentó 100X. A: Diferenciación “*in vitro*” evidenciada por los cambios en la morfología. B: Tinción específica para detectar rasgos característicos de la diferenciación. C: Control sin diferenciación con medio de cultivo α -MEM chang. La numeración correspondiente 1,2 y 3 es el número muestra procesada. Resultados a los 14 días de cultivo. Las flechas muestran los depósitos de fosfatos de calcio

En la figura 12, se observa las células más alargadas y con presencia de pequeños nódulos un poco más opacos que el resto las cuales son características de células en diferenciación hacia tejidos osteogénico (figuras 12 A1, A2, A3).

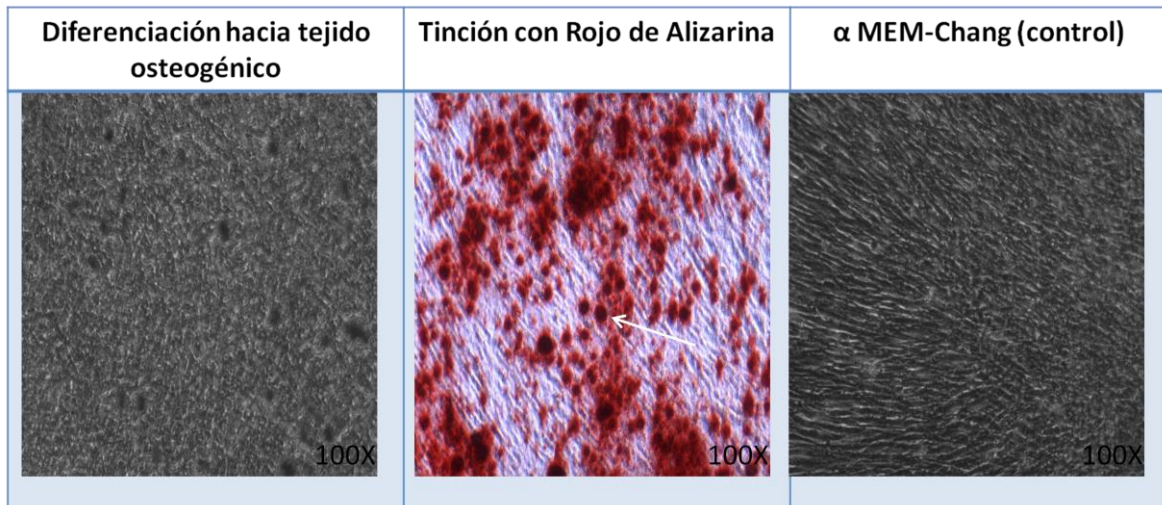


Figura 13. Diferenciación osteogénica “*in vitro*” de la muestra 4. Microscopia de luz. Aumento 100X . se observa a la izquierda la diferenciación osteogénica por el medio de inducción por 30 días, la fotografía en el medio indica la tinción con rojo de alizarina y la foto de la derecha el control con medio de mantenimiento.

La muestra 4, fue la muestra de tejido adiposo de menor peso, con la intención de evaluar la posibilidad de extraer muestras pequeñas de grasa a pacientes que requieran aislar CMM para algún procedimiento de terapia celular. Esta muestra fue caracterizada igual que las muestras anteriores, y permitió demostrar que una muestra de grasa de 13 g es suficiente para aislar CMM y que pueden ser expandidas hasta alcanzar el número de células necesarias para el estudio donde se requieran. Las CMM fueron diferenciadas a linaje osteogénico, donde se observó a partir de la segunda semana evidencia morfológica hacia ese linaje.

La figura 13, muestra evidencia de la diferenciación osteogénica *in vitro* de la muestra 4.

Estas células cultivadas en medio osteogénico, fueron teñidas con “Rojo de Alizarina”, el cual tiñó de color rojo los depósitos mineralizados de fosfato de calcio (figuras 12 B1, B2, B3), comprobando la diferenciación de éstas células hacia linaje osteogénico. En las figuras 12 C1, C2, C3, se pueden observar los controles de las tinciones, los cuales consistieron en células mantenidas al mismo tiempo de cultivo con medio de mantenimiento α -MEM chang.

Finalmente para la diferenciación condrogénica (figura 14) se sometió a las células a un medio que contenía los factores para la inducción de la diferenciación hacia linaje condrogénico (tabla 2) probando con dos tipos diferentes de cultivo.

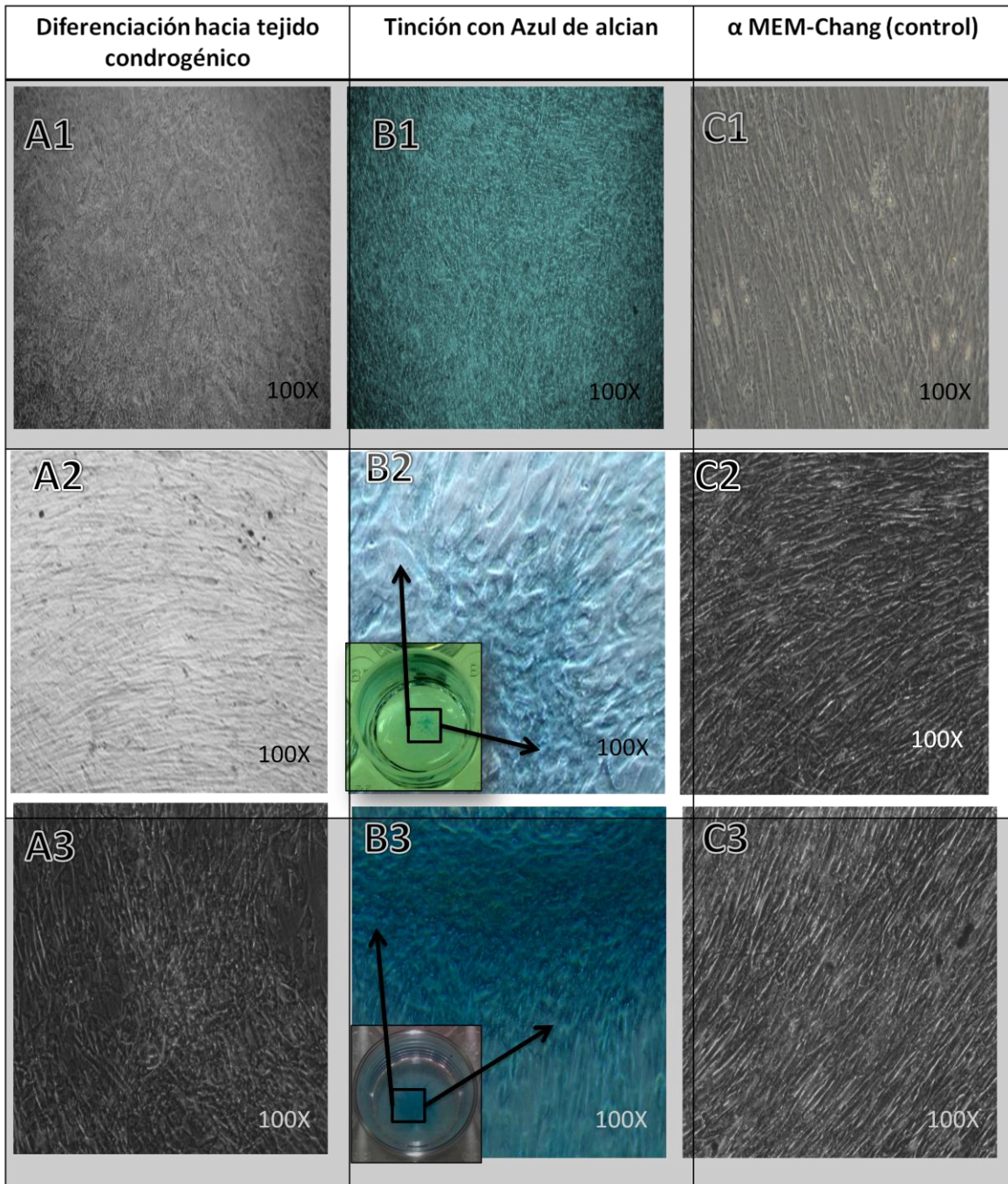


Figura 14. Diferenciación condrogénica “*in vitro*” de las muestras. Microscopio de luz, aumento 100 X. A: Diferenciación “*in vitro*” evidenciada por los cambios en la morfología: Tinción específica para detectar rasgos característicos de la diferenciación: Control sin diferenciación con medio de cultivo α -MEM chang. Se muestra con numeración 1,2 y 3 el número muestra procesada. Figura 14 B2 y B3 Representa un pozo de la placa sembrada con la técnica de micromasa después de la tinción

La diferenciación condrogénica de las CMM obtenidas de la primera muestra (Figura 14 A1-C1) fueron sembradas en placas de 24 pozos colocando 30.000 células/pozo, la morfología observada fue más entramada y con células más pequeñas, al momento de la tinción con azul de alciano luego de cuatro semanas de cultivo (figura 14 B1), la coloración fue uniforme en todo el pozo lo que nos llevó a modificar la técnica del cultivo por una nueva técnica denominada técnica de micromasa. Esta técnica consiste en sembrar una alta cantidad de células (80.000 células/pozo) en una gota de 10 μ L dejándola dos horas en incubación a 37° C con 5 % de CO₂; antes de añadirle el resto del medio de diferenciación, luego el cultivo se mantuvo por 28 días cambiando semanalmente el medio. En la muestra 2 y 3 se utilizó esta técnica. La Figura 14 B2, B3 muestra las células teñidas con azul de alciano, el cual tiñe los proteoglicanos, glicoaminoglicanos, ácidos carboxilados, componentes de matriz celular cartilaginosa (principales componentes de la matriz extracelular del cartílago) presentes en el pozo, confirmando la diferenciación de éstas células a tejido condrogénico. Los controles correspondientes a las figuras 14 C1, C2 y C3 conciernen a los cultivos con medio basal α -MEM chang, sin factores que induzcan la diferenciación, para las figuras 14 C2 y C3 fue realizado en cultivo por micromasa con las mismas condiciones que las correspondientes a la diferenciación condrogénica.

7. DISCUSIÓN

Por muchos años el tejido adiposo fue considerado un tejido inerte, cuya función se atribuyó al almacenamiento de la energía. Sin embargo, en los últimos años ha emergido como un órgano que participa en la regulación de diversos procesos tanto fisiológicos como patológicos, incluyendo inmunidad e inflamación. El tejido adiposo está compuesto por muchos tipos celulares, además de los adipocitos (que almacenan lípidos para almacenamiento de energía y actividad metabólica). Se sabe que dietas altas en carbohidratos y grasas generan nuevas células adiposas en el organismo adulto, ocasionando un desbalance nutricional (obesidad) (Kern y col., 2006).

Pese a que no se conoce con claridad cuáles son todos los procesos en el desarrollo de la adipogénesis en el tejido adiposo su precursor es una célula mesenquimal y mediante esta base, Zuk y colaboradores en el 2001 realizaron el aislamiento de las CMM-TA.

El tejido adiposo, al igual que la médula ósea, proviene del mesodermo embrionario y contiene una población heterogénea de células estromales. Las CMM-TA proceden de esta fracción vascular-estromal (FVS) del tejido adiposo, donde además se pueden encontrar otros tipos celulares como células endoteliales, células de músculo liso, fibroblastos, mastocitos, preadipocitos y otros tipos celulares circulantes como leucocitos o células madre hematopoyéticas (Tholpady y col., 2006). Esto hace que las CMM-TA aisladas constituyan una población heterogénea, pero gracias a su propiedad de adherencia al plástico

después del cultivo *in vitro*, dan lugar finalmente a una población celular con aspecto fibroblástico muy homogénea. Sin embargo, muchos factores pueden influir en la composición celular de estos cultivos, como la edad y estado del donante, el procedimiento de aislamiento, las condiciones de cultivo o el número de pases.

Sobre la base de los trabajos publicados, se obtuvo un rendimiento mayor al esperado, ya que este fue de 500.000 células de la FVS por gramo de grasa; si consideramos que del total de células de la FVS el 1% al 5% corresponde a CMM, al realizar la relación fue de 5000 a 25.000 CMM respectivamente. Al comparar los resultados con los obtenidos por Lasso y col., 2010 y Zuk y col., 2001; que reportan un máximo rendimiento de 5000 CMM por gramo, la metodología de aislamiento utilizada mantiene esta relación y efectivamente incrementa la cantidad de CMM-TA por gramo, correspondiendo a 25.000 células/g cuando en el aislamiento un 5% corresponde a este porcentaje celular.

El incremento del rendimiento, se debe a modificaciones en la metodología de aislamiento realizado, donde a diferencia de los trabajos anteriores como los de Zuk en el 2001 y Gimble en el 2007, no se realiza la lisis de eritrocitos, ya que se conoce que puede disminuir la viabilidad celular (Nauta y Fibbe, 2009). También se realizaron dos lavados previos con PBS antes de realizar la digestión, lo cual disgrega más las células del tejido adiposo y facilita la digestión con la colagenasa tipo I. Como se mencionó, luego de 72 horas se retiraron las células no adherentes y se continuó el cultivo hasta obtener una confluencia \geq a 80 %, el

rendimiento a partir de los frascos de cultivo fue de 40%, de 25.000.000 de células de la FVS sembradas, se obtuvieron aproximadamente 10.000.000 de células con la morfología fibroblastoide. Con este procedimiento se obtuvo las células adherentes que poseían alto potencial de proliferación, alcanzando una alta confluencia aproximadamente en seis días.

Un gramo de tejido adiposo sin procesar aspirado tiene 69×10^6 adipocitos y $2,1 \times 10^6$ de células no-adipocitos, resultando un 75% para adipocitos y solo un 25% de células diferentes a los adipocitos (Zhang y col., 2012). Entre estas células no-adipocitos tenemos: pericitos, células endoteliales, hematopoyéticas, y CMM, correspondiendo esta última con una proporción menor al 5 %. Sin embargo, esta proporción es mayor a la obtenida a partir de otras fuentes como la médula ósea que corresponde únicamente al 0,01 % de la muestra (Gimble y col., 2007). En comparación a los resultados mostrados (figura 6) no se puede afirmar la cantidad de adipocitos en la muestra ya que se realiza un lavado y filtrado previo al conteo de la viabilidad celular por lo tanto solo sacamos que la relación de las células no-adherentes y a las adheridas al plástico dan una relación de 5:2 respectivamente.

Las CMM-TA pueden definirse a través de un patrón de expresión de antígenos de diferenciación en su superficie. Por lo tanto se comprobó si las células adherentes derivadas del tejido adiposo presentaban el patrón de expresión de moléculas de superficie característico de las CMM. Para ello, se tiñeron con anticuerpos monoclonales conjugados con fluorocromos conocidos. Los

marcadores utilizados fueron escogidos de acuerdo al criterio establecido por la Sociedad Internacional para la Terapia Celular (*International Society for Cell Therapy*: ICST) que permite definir las CMM por la expresión de las siguientes moléculas: CD90, CD73, CD105, como marcadores positivos para CMM y CD14, CD34, CD45 y HLA-DR como marcadores negativos para CMM. Un marcador típico de las células B denominado CD19. Se incluyeron dos marcadores, las moléculas CD29 y CD166 relacionados con la adhesión de las células ya que han sido reportadas expresadas en las CMM. (Schaffer y col., 2007). Adicionalmente, se determinaron las moléculas CD31 y KDR que permiten identificar la presencia de células endoteliales las cuales podrían estar presentes en el tejido adiposo. Las células endoteliales recubren el interior de los vasos sanguíneos y sobre todo de los capilares, formando parte de su pared (Caplan y col., 2013).

Los resultados obtenidos por citometría de flujo (histogramas) que se muestran en la figura 9, permiten comprobar el patrón definido para las CMM. De esta manera, se detecta en todas las células estudiadas la presencia de los marcadores mesenquimales CD90, CD73, CD105, CD29 Y CD166 con un porcentaje ≥ 98 %, mientras que no se observó la presencia de marcadores propios de células hematopoyéticas como la molécula CD34 y CD45, marcador de leucocitos y HLA-DR, molécula de complejo mayor de histocompatibilidad tipo II. La ausencia de esta última molécula permite el uso de estas células de manera heteróloga sin riesgos a ser rechazadas (alotransplante). La ausencia de

expresión de CD31 y KDR permite descartar que las células adherentes fueran células endoteliales. Los fenotipos negativos que se obtuvieron anteriormente mencionados fueron $\leq 2\%$ de marcaje de expresión en la superficie de las células. El control negativo, conocido como el isotipo (que corresponde a al mismo anticuerpo pero de especificidad distinta) dió siempre un bajo marcaje parecido a la autofluorescencia de las células, lo que indicó que efectivamente no hay interacciones de unión no específicas. De esta forma se aseguró que el marcaje fuera lo más efectivo posible.

Todas las muestras se analizaron hasta el pasaje numero 3, encontrando diferencias significativas entre la FVS y los pasajes sucesivos. Esto debido al a que la FVS es una mezcla heterogénea que posee células de adipocitos, pericitos, CMM y células endoteliales, pero a medida que incrementa el pasaje se seleccionan únicamente las CMM.

El incremento en los marcadores típicos de CMM indica que en la forma de cultivo hay una selección para que solo las células que tenga esta característica se mantengan, además se realizó marcajes para verificar en la coexpresión (resultados no mostrado) donde se muestra en la FVS que tiene poblaciones diferentes y luego del primer pasaje ya está solo presenta una población más homogénea.

Las CMM-TA tienen potencial para diferenciarse *in vitro* hacia distintos linajes de origen mesenquimal, como son osteogénico, condrogénico y adipogénico,

cuando son inducidas por medio de factores presentes en los medios de diferenciación que induzcan este proceso.

Las células madre de tejido adiposo tienen el potencial de diferenciar hacia linaje adipogénico como se observó en la figura 11. En nuestros resultados de diferenciación *in vitro* hacia linaje adipogénico, tenemos que la evidencia morfológica fue muy efectiva, desde la primera semana se observaron vacuolas citosólicas lipídicas y al pasar la segunda semana, la mayor parte del cultivo estaba con la morfología característica, al realizar la tinción en todas las muestras se evidencia la presencia de lípidos en color rojo brillante muy evidente.

Los resultados de este trabajo muestran que CMM de tejido adiposo presentan alto potencial de diferenciación osteogénica (figura 12 y 13) desde las primeras dos semanas se observó los depósitos de fosfato de calcio que fueron efectivamente teñidos con rojo de alizarina. Trabajos precedentes muestran que las CMM-TA presentan distintos potenciales de diferenciación osteogénica y una capacidad de regeneración ósea en menores tiempos comparados a las CMM. Sin embargo, estos resultados de comparación en cuanto a la diferenciación ósea *in vitro* y regeneración ósea *in vivo* debe ser mejor estudiados (Kutnetsov y col., 1997; Gronthos y col., 2003).

Para la diferenciación condrogénica se necesitó estandarizar dos sistemas de cultivos, una inicial en forma de monocapa en placa de 24 pozos, con aproximadamente 40.000 células por pozo, en la cual la diferenciación condrogénica no fue lo esperado y se modificó un cultivo por otro tridimensional

llamado micromasa realizado primeramente por ZuK y colaboradores en el 2002, colocando una gota en una placa de 24 pozos con medio de diferenciación condrogénica, en el cual obtuvimos diferenciación con una tinción positiva para azul de alciano (Figura 16). Por medio de la tinción azul de alcian, se tiñeron los proteoglicanos en el centro de la micromasa mostrando efectivamente que hay precursores de linajes condrogénico, la morfología de las células al ser un cultivo tridimensional no fue fácil de observar pero en la placa, sin embargo presenta un crecimiento hacia una irradiación positiva de la micromasa, donde se puede apreciar que poseen pequeños nódulos y son con forma de huso muy delgado. Podemos decir que éstas células de origen mesenquimal, son capaces de diferenciarse en condrocitos en la presencia del TGF- β , ácido ascórbico, y dexametasona en combinación con un entorno de cultivo 3D (Parra y col., 2010).

8. CONCLUSIONES

Este trabajo permitió estandarizar una metodología para la obtención de CMM-TA y estudiar su potencial de diferenciación mediante la realización de ensayos preclínicos “*in vitro*”, los resultados de este proyecto corroboran las ventajas de la obtención de CMM a partir de tejido graso, y su factible utilización en procedimientos de terapia celular para regeneración de tejidos.

- 1) El tejido adiposo es una excelente fuente para la obtención de un gran número de CMM alcanzando rápidamente una alta confluencia del cultivo primario luego de 6 días de obtención de la FVS.
- 2) El rendimiento obtenido de CMM-TA a partir de la FVS fue de aproximadamente de 5.000 a 25.000 células por 1 gramo de tejido adiposo de remanente del procedimiento de liposucción.
- 3) Las CMM provenientes del tejido adiposo poseen morfología fibroblastoide y un inmunofenotipo típico de CMM mostrando una alta expresión (superior a 95 %) de CD90, CD73, CD105, CD29 y ausencia de expresión (inferior a 2 %) de las moléculas CD14, HLA-DR y CD19.
- 4) La expresión de los marcadores positivos aumento a medida que incrementaron los pasajes de cultivo, llegando hasta el 100% de expresión después del segundo pasaje.

- 5) La diferenciación "*in vitro*" a linajes condrogénicos, osteogénicos y adipogénicos fue evidente luego de dos semanas de cultivo en medios de diferenciación específicos para cada linaje y se comprobó mediante las tinciones celulares.
- 6) Las CMM-TA obtenidas cumplieron con los tres criterios establecidos por la ISCT.

9. RECOMENDACIONES

- Estudiar la diferenciación de las CMM-TA hacia linajes osteogénicos, condrogénicos y adipogénicos por medio de la determinación de la expresión de marcadores específicos para estos linajes, a nivel del ARNm; con la finalidad de comprobar la diferenciación a nivel genético.
- Estudiar la capacidad de diferenciación de las CMM-TA hacia el linaje neuronal y el linaje endotelial.
- Realizar ensayos preclínicos en un modelo murino "*in vivo*" para corroborar la diferenciación hacia el linaje osteogénico, para así evaluar su posible aplicación en modelos de regeneración ósea en humanos.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Ailhaud, G., Grimaldi, P. 1992. Cellular and molecular aspects of adipose tissue development. *Annu. Rev. Nutr.* **12**:207-33.
- Aggarwal, S., Pittenger, F. 2005. Human mesenchymal stem cells modulate allogenic immune cells responses. *Blood.* **105** (4): 1815-1822.
- Alvarez, P., García-Arranz, M., Georgiev-Hristov, T., García-Olmo, D. 2008. A new bronchoscopic treatment of tracheomediastinal fistula using autologous adipose-derived stem cells. *Thorax.* **63**:374-6.
- Ashjian, P. , Elbarbary, A. , Edmonds, B., De Ugarte, D., Zhu, M., Zuk, P., Lorenz, H., Benhaim, Hedrick, M. 2003. In vitro differentiation of human processed lipoaspirate cells into early neural progenitors. *Plast. Reconst. Surg.* **111**:1922-31.
- Bartholomew, A., Sturgeon, C., Siatskas, M., Ferrer, K., McIntosh, K., Patil, S., Hardy, W., Devine, S., Ucker, D., Deans, R., Moseley, A. y Hoffman R. 2002. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival *in vivo*. *Exp. Hem.* **30** (1): 42-48
- Bernad, A., Lloyd, A. 2005. Spontaneous human adult stem cell transformation. *Cancer. Res.* **65**: 3035-9.
- Burckhardt, D., Butchart, E., Gohlke-Bärwolf, C., Acar J., Oakley, C., Bodnar, E., Hall, y colaboradores. 1995. Guidelines for prevention of thromboembolic events in valvular heart disease. *Eu. Heart J.* **7**: 10-21.

- Butler, D., Goldstein, S., Guilak, F. 2000. Functional tissue engineering: the role of biomechanics. *J. Biomech. Eng.* **122**:570-5.
- Campagnoli C., Roberts I., Kumar S., Bennett P., Bellantuono y Fisk N. 2001. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first trimester fetal blood, liver and bone marrow. *Blood.* **98**: 2396-2402.
- Caplan A., Murphy M., Moncivais, K. 2013. Mesenchymal stem cells: environmentally responsive therapeutics for regenerative medicine. *Exp. Mol. Med.* **45**: e54, 10.1038/emm94.
- Davatchi, F., Abdollahi, B., Mohyeddin, M., Shaheram, F., Nikbin, B. 2011. Mesenchymal stem cell therapy for knee osteoarthritis. Preliminary report of four patients. *Int. J. Rheum. Dis.* **14**: 211-215.
- Enzi, G. 1981. Intrauterine growth and adipose tissue development. *Am. J. Clin. Nutr.* **34**:1785-90.
- Fang, B., Song, Y. 2007. Favorable response to human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells in steroid-refractory acute graft-versus-host disease. *Transplant. Proc.*, **39**:3358-62.
- Finn, G. 1997. Tejido Adiposo. *En: Histología. De. Editorial Panamericana.* Sexta edición. Mexico D.F. México.
- Friedenstein, A., Deriglasova, U., Kulagina, N., Panasuk, A., Rudakowa, S., Luriá, E., Ruadkow, I. 1960. Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. *Exp. Hematol.* **2**(2):83-92.

- Ganey T., Hutton W., Moseley T., Hedrick M., Meisel H. 2009. Intervertebral disc repair using adipose tissue-derived stem and regenerative cells: experiments in a canine model. *Spine* .**34**: 2297–2304
- García-Olmo, D., Herreros, D., Pascual, M., Pascual, I., De-La-Quintana, P., Trebol, J., García-Arranz, M. 2009. Treatment of enterocutaneous fistula in Crohn’s Disease with adipose-derived stem cells: a comparison of protocols with and without cell expansion. *Int. J. Colorectal Dis.*, **24**:27-30.
- Gaustad K., Boquest A., Anderson B., Gerdes A., Collas P. 2004. Differentiation of human adipose tissue stem cells using extracts of rat cardiomyocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **314**, 420-427.
- Gimble, J., Erickson, G., Franklin, D., Rice, H., Awad, H., Guilak, F. 2002a. Chondrogenic potential of adipose tissue-derived stromal cells *in vitro* and *in vivo*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **290**:763-9.
- Gimble, J., Katz, A., Bunnell, B. 2002b. Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circ. Res.*, **100**:1249-60
- Gimble, J., Safford, K.; Hicok, K., Halvorsen, Y., Wilkison, W., Rice, H. 2007. Neurogenic differentiation of murine and human adipose derived stromal cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **294**:371-379.
- González-Rey E., González M., Varela N., O’Valle F., Hernandez-Cortes P., Rico L. 2010. Human adipose-derived mesenchymal stem cells reduce inflammatory and T cell responses and induce regulatory T cells *in vitro* in rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* **69**: 241–248.

- Goldrick, R. 1967. Morphological changes in the adipocyte during fat deposition and mobilization. *Am. J. Physiol.* **212**:777-82
- Gronthos, S., Zannettino, A., Hay, S., Shi, S., Graves, S., Kortessidis, A., Simmons, P. 2003. Molecular and cellular characterization of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow. *J. Cell Sci.* **116**: 1827-1835.
- Hager, A. 1977. Body fat and adipose tissue cellularity in infants. *Metabolism.* **26**:607-614.
- Hausman, G., Hausman, D. 2006. Search for the preadipocyte progenitor cell. *J. Clin. Invest.* **116**:3103-3107.
- Hernigou P., Poignard A., Beaujean F. y Rouard H. 2005. Percutaneous autologous bone-marrow grafting for nonunions. *J. Bone. Joint. Surg.* **87** (7):1430–1437.
- Hedrick, M., Lendeckel, S., Jödicke A., Christophis, P., Berthold, L., Heidinger, K. Wolff, J. y colaboradores. 2003. Autologous stem cells (adipose) and fibrin glue used to treat widespread traumatic calvarial defects: case report. *Jo. CranioMaxillofacial Surg.* **32** (6): 370-373
- Horwitz, E., Le Blanc, K., Dominici, M., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Deans, R. y colaboradores. 2005. International Society for Cellular Therapy. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, **7** (5):393-5.

- Jaiswal, O., Elzouki A. 1997 Evaluation of chlorambucil therapy in steroid-dependent and cyclophosphamide-resistant children with nephrosis. *Pediatr. Nephrol.* **4**:459-462.
- Kern, S., Eichler, H., Stoeve, J., Kluter, H., Bieback, K. 2006. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood or adipose tissue. *Stem Cells*, **24**: 1294-1301.
- Kindt, T., Goldsby, R., Osborne, B. 2006. Inmunología de kuby. Editorial Mc Graw Hill. Sexta Edición. Caracas, Venezuela.
- Knittle, J. 1968. Effect of early nutrition on the development of rat epididymal fat pads. *J. Clin. Invest.* **47**: 2091-2098.
- Kuznetsov, S., Krebsbach, P., Satomura, K., Kerr, J., Riminucci, M., Benayahu, D., Robey, P. 1997. Single-colony derived strains of human marrow stromal fibroblasts form bone after transplantation in vivo. *J. Bone Miner. Res.* **12**: 1335–1347.
- Lasso, J., Cortina, E., Goñi, E., Arenas, L., Nava, P., Fernandez, M., Perez Cano, R. 2010. Estado actual de las terapias con células madre derivadas de tejido adiposo en el ámbito de la cirugía plástica. *Cir. Plast. Ibero-latinoam.* **36** (3): 215-221.
- Le Blanc, K., Tammik, C., Rosendahl, K., Zetterberg, E., Ringden, O. 2003. HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. *Exp. Hematol.* **31**: 890-896.

- Locke, M., Feisst, V., Dunbar P. 2011. Consise Review: Human Adipose-Derived stem cells: separating promise from clinical need. *Stem Cells*. **29** (3): 404-411.
- Maccario, R., Podesta, M., Moretta, A., Cometa, A., Comoli, P., Montagna, D., Daudt, L. y colaboradores. 2005. Interaction of human mesenchymal stem cells with cells involved in alloantigen-specific immune response favors the differentiation of CD4+ T-cell subsets expressing a regulatory/suppressive phenotype. *Haematol*. **90** (4): 516-525.
- Mahendroo M., Mendelson C., Simpson E. 1993. Tissue-specific and hormonally controlled alternative promoters regulate aromatasecytochrome P450 gene expression in human adipose tissue. *J Biol. Chem*. **268**: 19463-19470.
- Nauta, A., Fibbe, W. 2009. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. *Blood*. **110**: 3499-3506.
- Noël, D., Djouad, F., Bouffi, C., Mrugala, D., Jorgensen, C. 2007. Multipotent mesenchymal stromal cells and immune tolerance. *Leu. Lymphoma* **48**: 1283-1289.
- Otto, T., Lane, M. 2005. Adipose development: from stem cell to adipocyte. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol*. **40**: 229-242.
- Parra, N., Garzón, D. y Cardozo, C. 2010. Aproach to chondrocytes culture in National University of Colombia. A technical report. *Rev. Cu. Invest. Bioméd*. **29**(1): 105-125

- Pelosi, L., Lamb, J., Grevitt, M., Mehdian, S., Webb, K. 2002. Combined monitoring of motor and somatosensory evoked potentials in orthopaedic spinal surgery. *Cli. Neurophy.* **113** (7): 1082-1091
- Pettersson P., Van R., Karlsson M. y Bjorntorp P. 1985. Adipocyte precursor cells in obese and non obese humans. *Metabolism* **34**: 808-812.
- Pineda C., Londoño C. 2009. Obtención de Células madre mesenquimales del tejido adiposo y su potencial de diferenciación osteogénico. *Rev. Ing. Biomed.* **3** (5): 58-65.
- Pittenger, M., Mackay, A., Beck, S., Jaiswal, R., Douglas, R., Mosca, J., Moorman, M. y colaboradores. 1999. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, **284**:143-7.
- Poissonnet, C. 1983. Growth and development of human adipose tissue during early gestation. *Early. Hum. Dev.* **8** (1):11.
- Ramalho-Santos M., Willenbring H. 2007. On the origin of the term “Stem Cell”. *Cell Stem Cell.* **1**:35-38.
- Rodríguez, A., Pisani, D., Dechesne, C., Turc-Carel, C., Kurzenne, J. Y., Wdziekonski, B., Villageois, A., y colaboradores. 2005. Transplantation of a multipotent cell population from human adipose tissue induces dystrophin expression in immunocompetent mdx Mouse. *J. Exp. Med.* **201**:1397-405.

- Safford K., Rice H. 2005. Stem cell therapy for neurologic disorders: therapeutic potential of adipose-derived stem cells. *Curr. Drug. Targets.* **6**: 57-62.
- Schäffler, A., Büchler, C. 2007. Concise review: Adipose tissue-derived stromal cells basic and clinical implications for novel cell-based therapies. *Stem Cells.* **25**:818-827.
- Scott, D. y Stevenson. C. 1964. Osteochondritis dissecans of the knee in adults. *Clin. Orthop.* **76**: 82
- Singh, S., Arora, R., Handa, K., Khraisat, A., Nagajothi, N., Molnar, J, Khosla, S. 2009. Stem cells improve left ventricular function in acute myocardial infarction. *Clin. Cardiol.* **32**: 176-80.
- Suga H., Matsumoto D., Inoue K., Shigeura T., Eto H., Aoi N., Kato H., Abe H., Yoshimura K. 2008. Numerical measurement of viable and nonviable adipocytes and other cellular components in aspirated fat tissue. *Plast. Reconstr. Surg. Jul.* **122**(1):103-114.
- Tse, W. T., Pendleton, J. D., Beyer, W. M., Egalka, M. C., Guinan, E. C. 2003. Suppression of allogenic T cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation. *Transplantation*, **15**: 389-397.
- Till J. y Mc Culloch E. 1963. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat. Res.* **14**:213-224.
- Tholpady, S., Llull, R., Ogle, R., Rubin, J., Futrell, J., Katz, A. 2006. Adipose tissue: stem cells and beyond. *Clin. Plast. Surg.* **33**: 55-62.

- Uccelli, A., Pistoia, V. y Moretta, L. 2007. Mesenchymal stem cells: a new strategy for immunosuppression?. *Trends, Inmunol.* **28**(5):221-6.
- Verfaillie C. 2002. Adults Stem Cells: assessing the case for pluripotency. *Trends cell boil.* **12**: 502-508.
- Wagner, E., Eferl, R. 2003. AP-1: a double-edged sword in tumorigenesis. *Nat. Rev. Cancer.* **3**(11):859-868.
- Yoshimura, K., Sato, K., Aoi, N., Kurita, M., Hirohi, T. y Harii, K. 2008. Cell-assisted lipotransfer for cosmetic breast augmentation supportive use of adipose-derived stem/stromal cells. *Aesthetic Plast. Surg.*, **32**:48-55.
- Zhang, Y., Wang, F., Chen, J., Ning, Z., Yang, L. 2008. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells versus bone marrow nucleated cells in the treatment of chondral defects. *Int. Orthop.* **36**: 1079-1086.
- Zuk, P. A., Zhu, M., Mizuno, H., Huang, J., Futrell, J. W., Katz, A. J., Benhaim, P. y colaboradores. 2001. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng.*, **7**:211-28.
- Zuk, P. A, Zhu M., Mizuno, H. Lorenz, H. P., Benhaim, P., Hedrick, M. H. 2002. Myogenic differentiation by human processed lipoaspirate cells. *Plast. Reconstr. Surg.* **109**:199-209.
- **Consultas en línea:**
- ASPS. Procedures realized by the surges on certified by the American Board of Plastic Surgery, 2013. Referencia web: <http://www.plasticsurgery.org/> [consulta en línea: 25/03/2014]
- www.biologend.com referencia web: [consulta en línea 15/11/2013]

ANEXOS Y APENDICES

Caracas, 29 de noviembre de 2012.

Dr. Rubén Contreras
Piso 2, Consultorio 219
Presente.-

Estimado Dr. Contreras:

Luego de saludarlo, nos dirigimos a usted, para notificarle la decisión tomada en la reunión del Comité de Bioética celebrada el día 29/11/12, con relación al protocolo clínico:

PROTOCOLO: AISLAMIENTO, CULTIVO Y EXPANSIÓN DE CÉLULAS MADRES MESENQUIMALES PROVENIENTES DE TEJIDO GRASO

1. El Comité de Bioética del Instituto Médico La Floresta, decidió replantear el Protocolo de Estudio Clínico ya que el mismo consiste en sólo aprobar el uso del tejido graso posterior al procedimiento.
2. Se recomienda que en el Consentimiento Informado incluya la autorización para el uso del tejido graso obtenido de la liposucción, el cual usualmente es descartado.
3. En el protocolo debe estar especificado el financiamiento, que el mismo es una donación del paciente, quien no recibe remuneración; además, que cuentan con la contribución del INSTITUTO VENEZOLANO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS.
4. Se anexa modelo de protocolo similares como guía para el Protocolo
5. Una vez, completado los pasos previos, por favor, nos debe comunicar el inicio del periodo de enrolamiento de pacientes.

Nos complace felicitarlo por haber sido elegido entre otros colegas para llevar a cabo este Proyecto de Investigación.

Sin otro particular al cual hacer referencia,

Atentamente,



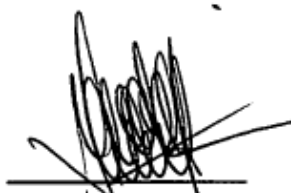
Dra. Olivia González C.
Presidente
Comité de Bioética Instituto Médica La Floresta



1-20140803-9

CONSENTIMIENTO VALIDO

Yo, Luisa Caicedo c.i.: V-6.280.173
Nacionalidad Venezolana Estado Civil Casada Domiciliado (a) en:
av. Alameda, Res. Royal Park siendo mayor de 18
años, en uso pleno de mis facultades mentales, declaro estar de acuerdo en donar el tejido
graso extraído durante el procedimiento de liposucción al cual seré sometida (o) por el Dr.
Rubén Contreras debido a: lipodistrofia. Estoy en conocimiento que
el tejido graso obtenido durante esta cirugía es descartado. Autorizo que 60 mililitros de este
tejido y 50 mililitros de sangre, sean enviados a la Unidad de Terapia Celular del Instituto
Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), bajo la responsabilidad del Dr. José
Cardier y la Dra. María Elena Márquez, en donde se procesará para el aislamiento y estudio,
con fines de investigación, de las células provenientes del tejido graso extraído. Bajo ninguna
circunstancia será obtenido ADN (material genético) de la muestra.



Firma del Paciente Luisa Caicedo
Nombre
C.I. V-6280173
Lugar Caracas Fecha 18/2/2013



Firma del Médico Tratante
Nombre RUBEN CONTRERAS
C.I. 6326543
Lugar 18/2/13 Fecha



Firma del Testigo
Nombre Jonathan Zoubrav
C.I. 1875DB01
Lugar Co Fecha 18/2/13

12. Apéndices

12.1) Glosario de términos

Adipocitos. Células esféricas o poliédricas que conforman el tejido adiposo. Están especializadas en la síntesis y almacenamiento de sustancias lipídicas en una gran vacuola del *citoplasma*.

Adipogénesis. *Proceso de diferenciación de los adipocitos regulado por factores de crecimiento, hormonas y citoquinas. El proceso de adipogénesis implica la activación de una cascada altamente coordinada y regulada de factores de transcripción que, en conjunto, conducen al establecimiento del estado diferenciado.*

ADSC (*Adipose-Derived Stem Cells*). Células madre multipotentes, derivadas de la fracción estromal del tejido adiposo. Pueden diferenciarse hacia linajes específicos como el adipogénico, condrogénico, osteogénico, miogénico o neurogénico.

Isotipo: se denomina así a las distintas clases y subclases de inmunoglobulinas según la región constante de las cadenas pesadas pero específico para cada especie, en particular se utiliza como control negativo en la citometría, utilizando un isotipo de especificidad distinta a las células a las cuales se está marcando para corroborar que no hay interacciones no específicas entre ellas.

MHC II: Son moléculas compuestas por dos cadenas polipeptídicas (a y b) codificadas por HLA-DR. Se relaciona con la presentación de antígenos a los linfocitos CD4⁺.

Suero Fetal Bovino para Células Madre: es un producto único de gran importancia en la ciencia, especialmente en los campos de la medicina y de la biotecnología. El SFB es un subproducto derivado del faenamiento de vacas preñadas. El SFB es el único medio universal aplicable para el cultivo y proliferación *in vitro* y en la producción biológica de células animales. Aunque la composición, los efectos y las interacciones exactas de todos los componentes de SFB tienen todavía que ser esclarecidas (descubiertas), los componentes principales pueden ser resumidos como sigue: Proteínas necesarias para la adherencia de las células a la matriz de soporte, Enzimas y Hormonas proteicas, Factores específicos de promoción del desarrollo celular, Factores de inhibición del desarrollo celular, Hormonas no proteicas, Lípidos esenciales para el desarrollo, diferenciación y multiplicación celular, Minerales , Metabolitos y nutrientes

12.2) Medios y soluciones utilizadas en cultivo celular

12.1) PBS (solución buffer de fosfato salino)

Cloruro de Sodio (NaCl).....8 g

Di-sodio hidrogeno fosfato dodecahidrato ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$).....0,2g

Cloruro de Potasio (KCl)0,2 g

12.2) MEDIO DE MANTENIMIENTO O BASAL (α -MEM Chang)

α -MEM.....29 ml

Chang B.....9 ml

2% Chang C.....1 ml

20% SFB.....10 ml

1% Antibiótico/ Antimicótico0,5 ml

1% L-Glutamina.....0,5ml

Volumen total.....50 ml

12.3) MEDIO DE TRANSPORTE

α -MEM.....40 ml

20% SFB.....10 ml

Volumen total.....50 ml

12.4) COLAGENASA I al 0,075%

Colagenasa I <i>Constridium</i> 1 U/mg.....	0,015g
PBS.....	50 mL

12.5) MEDIOS DE DIFERENCIACIÓN

12.5.1) MEDIO DE DIFERENCIACIÓN OSTEOGÉNICO

α -MEM chang.....	24,33 mL
Dexametasona.....	1 μ L
Fosfato inorgânico K_2HPO_4	250 μ L
B-Glicerolfosfato.....	1250 μ l
Acido Ascorbico.....	170 μ l

12.5.2) MEDIO DE DIFERENCIACIÓN ENDOTELIAL

Medio MCBO.....	20,5 mL
SFB.....	2,5 mL
L-Glutamina.....	1,25 mL
Antibiotico/Antimicotico.....	250 μ L
HuEGF.....	25 μ L

12.6) SOLUCIONES STOCK DE LOS FACTORES PARA LOS MEDIOS DE DIFERENCIACIÓN

2.6.1) Acido ascórbico 1M

Acido ascórbico..... 1,76 g

PBS..... 10 mL

12.6.2) B- Glicerolfosfato 1M

B-Glicerolfosfato.....3,1 g

Agua Bidestilada Desionizada.....10 mL

12.7) SOLUCIONES FIJADORAS

12.7.1) PFA 4%

PFA concentrado..... 2g

PBS.....50 mL

Ajustar a pH 7,45 y filtrar con papel Whatman nº4 0,9 nm

12.7.2) PFA 10%

PFA concentrado..... 5g

PBS.....50 mL

Ajustar a pH 7,45 y filtrar con papel Whatman nº4 0,9 nm

12.8) SOLUCIONES COLORANTES

12.8.1) SOLUCION ROJO DE ALIZARINA S AL 2%

Reactivo Rojo de Alizarin S.....0,1 g

Agua destilada a 65° C.....5 mL

Ajustar el pH entre 4,1 a 4,4 con Hidróxido de amonio al 10%

Filtrar con papel Whatman nº4 0,9 nm

12.8.2) SOLUCION STOCK DE OIL RED AL 1%

Oil Red.....150 mg

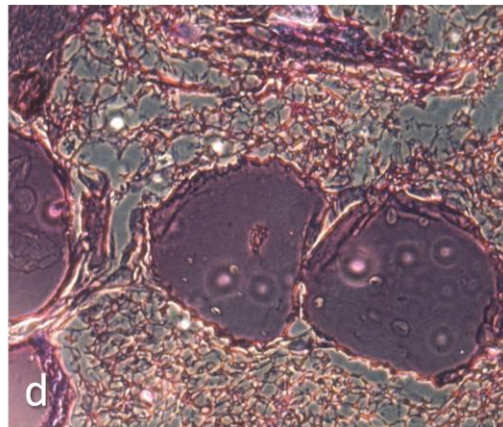
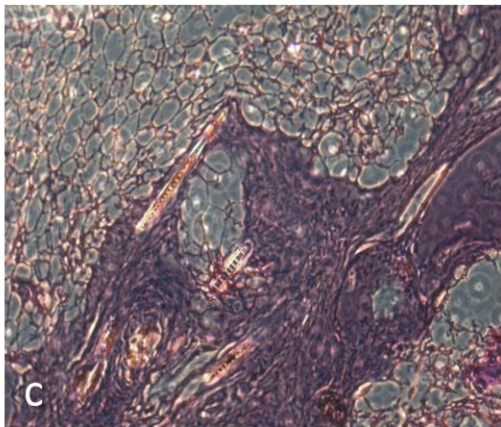
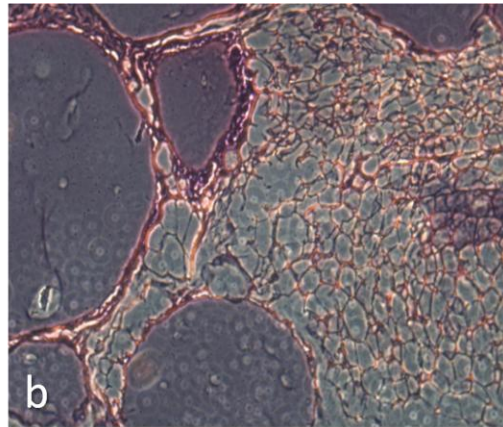
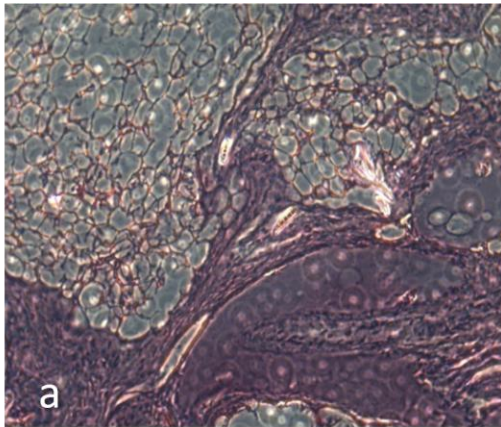
Isopropanol 99%50mL

12.8.3) SOLUCION DE AZUL DE ALCIAN pH 2,5

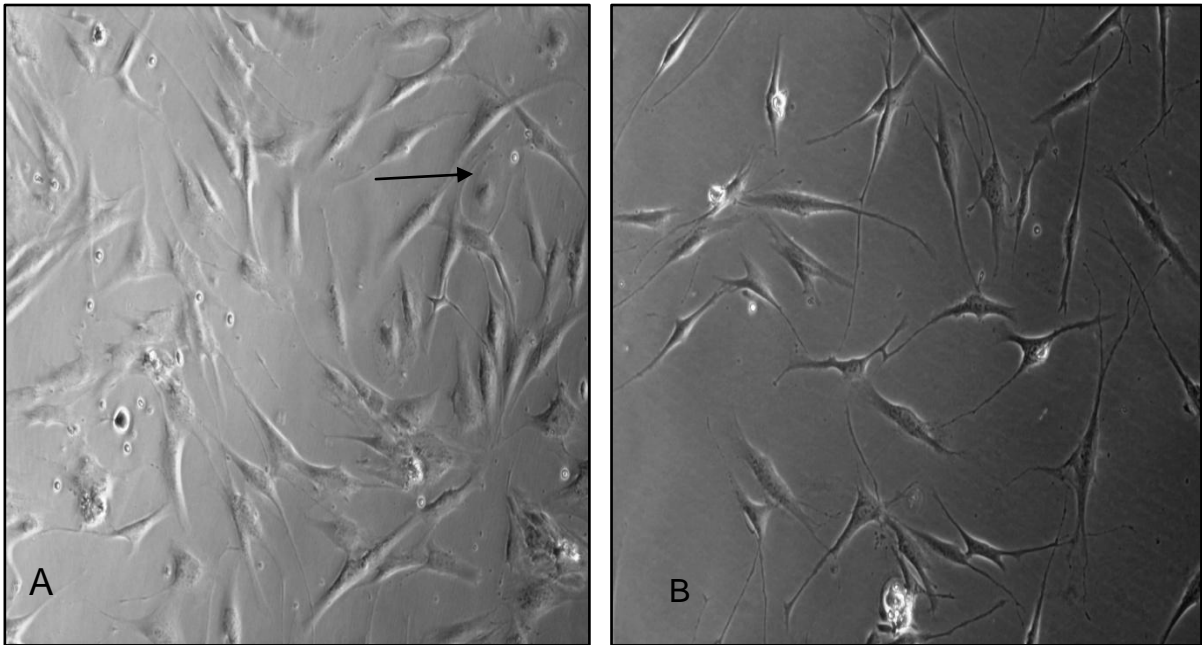
Azul de alcian 8GX.....3 g

Acido Acético 100%.....100 mL

Estudio previo de las recomendaciones realizadas:



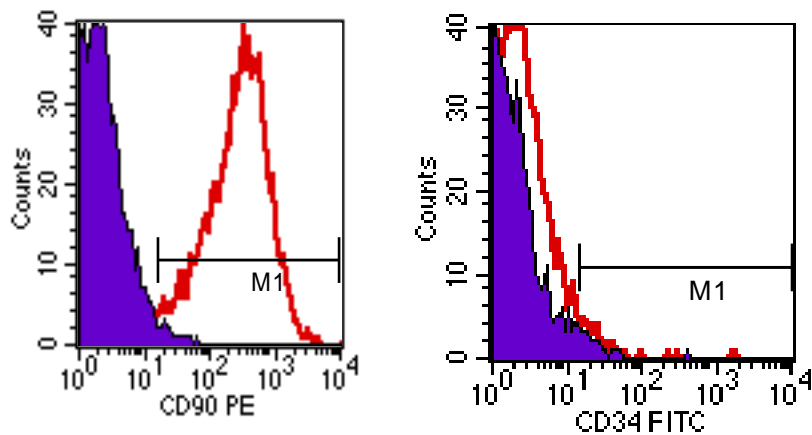
Resultados de histología de cortes de la masa obtenida de los ratones con tinción de Hematoxilina-Eosina. Se observa en los cortes histológicos, realizados a partir de la muestra 1. Se observa una formación de tejido del tipo trabecular y los espacios redondeados corresponden a la posición de la microperlas extendidas.



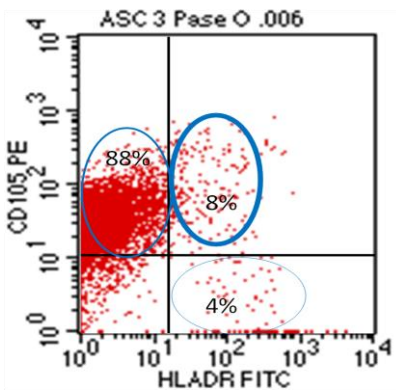
En figura A se muestra como están unas células sembradas en atello-colageno para promover la inducción a células endoteliales directamente de la FVS de la muestra 3, se observa que hay algunas células que se están uniendo para tener la forma típica de una células endotelial (flecha negra)

En la figura B tenemos células de la FVS creciendo en medio inductor de diferencia endotelial, se observa poca confluencia y algunas celulas con morfología típica endotelial (flecha negra).

Se realizo una citometría una vez que las células llegaron a una confluencia mayor a 60 % para comprobar que expresaban moléculas características de vascularización.



En los resultados más destacados de la citometría tenemos que al contrario que se esperaba mantuvo un marcaje positivo para las células madre mesenquimales y negativo para las endoteliales.



Se realizó un análisis de coexpresión entre los marcadores típicos de CMM y algunos hematopoyéticos y endoteliales dando como resultado dos poblaciones aisladas y una mayoritaria para la expresión mesenquimal con solo un pase de cultivo.