



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA

FACULTAD DE MEDICINA

COMISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

CURSO DE ESPECIALIZACIÓN EN CIRUGÍA PLÁSTICA Y RECONSTRUCTIVA

HOSPITAL UNIVERSITARIO DE CARACAS

**DIFERENCIACIÓN DE LAS CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES,
HEMATOPOYÉTICAS Y PLASMA RICO EN PLAQUETAS EN TEJIDO
ADIPOSO ADULTO IN VITRO**

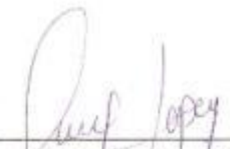
Trabajo Especial de Grado que se presenta para optar al título de Especialista en
Cirugía Plástica y Reconstructiva

Bernardette Guadalupe Gil Masroua

Caroll Joyce May Correa

Tutor: Jenny López

Caracas, diciembre 2014



Tutor: Dra. Jenny/P. López
Adjunto Hospital Universitario de Caracas



Dra. Carmen Acosta
Jefe de Servicio del postgrado de Cirugía Plástica y Reconstructiva
Hospital Universitario de Caracas



Dra. Alejandra Moreno
Coordinador Docente del postgrado de Cirugía Plástica y Reconstructiva
Hospital Universitario de Caracas

DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTOS

Queremos dedicar nuestro Trabajo Especial de Grado ante todo a Dios y la Virgen de Guadalupe quienes nos guían y protegen siempre, porque por ellos tenemos amor por lo que hacemos y luchamos por nuestros sueños y metas.

A nuestros padres, por ser el apoyo incondicional que recibimos a lo largo de este camino, fueron guía y enseñanza de amor y constancia. A ustedes que son el soporte y base de nuestra formación profesional y personal; son el motor que nos impulsa a seguir adelante en la búsqueda de nuestros sueños y metas.

A nuestra familia por acompañarnos en los momentos de alegrías y tristeza, apoyándonos y formando siempre parte de nuestros éxitos con su permanente compañía invaluable y espontánea que siempre nos brindan para ser parte de ese bastón que nos mantiene de pie en la vida y sus obstáculos.

A mi abuela Gladys Obadía que desde el cielo me acompaña siempre, quien siempre fue alegría y amor en mi vida.

A nuestra tutora, la Dra. Jenny López, porque nos impulsa a buscar siempre la actualización constante en nuestra carrera, para poder cada vez ser mejores profesionales.

A nuestros amigos que son la familia que escogemos en la vida.

GRACIAS A TODOS.

ÍNDICE DE CONTENIDO

RESUMEN	5
INTRODUCCIÓN	7
MÉTODOS	21
RESULTADOS	28
DISCUSIÓN	32
CONCLUSIONES	33
RECOMENDACIONES	33
REFERENCIAS	34
ANEXOS	42

RESUMEN

Bernardette Guadalupe Gil Masroua, C.I. 16.204.431. Sexo: Femenino, E-mail: Bernardette_g@hotmail.com. Telf: 0414-2492818/0212-9432762. Dirección: Hospital Universitario de Caracas. Especialización en Cirugía Plástica y Reconstructiva.

Caroll Joyce May Correa, C.I. 16.116.914. Sexo: Femenino, E-mail: Carollmay@hotmail.com. Telf: 0414-0528108/0243-2460720. Dirección: Hospital Universitario de Caracas. Especialización en Cirugía Plástica y Reconstructiva.

Tutor: Jenny López, C.I. 16.246.032. Sexo: Femenino, E-mail: jenny_lopez1978@hotmail.com. Telf: 0416-6104277. Dirección: Hospital Universitario de Caracas. Especialista en Cirugía Plástica y Reconstructiva.

RESUMEN

Diferenciación de las células madre mesenquimales, hematopoyéticas y plasma rico en plaquetas en tejido adiposo adulto in vitro

Objetivo: Descripción de la técnica del aislamiento y cultivo de las células madre y su diferenciación a tejido adiposo mediante un proceso controlado. Se evalúan la diferenciación a partir de células madre mesenquimales, de células madre hematopoyéticas y ambas células madre con factores de crecimiento mediante plasma rico en plaquetas. **Método:** Las células madre mesenquimales son obtenidas de grasa abdominal de 2 pacientes por medio de liposucción, las células madre hematopoyéticas son obtenidas de la médula ósea de las pacientes mediante punción de la cresta ilíaca y el plasma rico en plaquetas es obtenido de la sangre periférica. Se preparan cuatro placas de petri. Una cápsula va a ser el control con solo tejido adiposo puro, otra con tejido adiposo puro y células madres mesenquimales, otra con tejido adiposo puro y células hematopoyéticas y la última con tejido adiposo puro con ambas células madre y factores de crecimiento por medio del plasma rico en plaquetas. Se evaluará su diferenciación a tejido adiposo. **Resultados:** El resultado fue satisfactorio evidenciándose la diferenciación de células madres a tejido adiposo adulto. Se calculó

satisfactoriamente la eficacia plaquetaria y las células madre mesenquimales y hematopoyéticas. **Conclusiones:** El procedimiento es factible y reproducible. Se evidenció la diferenciación en todos los procedimientos hacia tejido adulto. **Palabras clave:** PLASMA RICO EN PLAQUETAS (PRP) – CÉLULAS MADRE HEMATOPOYÉTICAS – CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES – DIFERENCIACIÓN.

ABSTRAC

Differentiation of mesenchymal stem cells, hematopoietic and platelet rich plasma in vitro adult adipose tissue

Objective: description of the isolation technique and culture of stem cells and their differentiation to adipose tissue in a controlled process. Are evaluated from the differentiation of mesenchymal stem cells, hematopoietic stem cells and both stem cells with growth factors by platelet rich plasma. **Methods:** Mesenchymal stem cells are obtained from 2 patients with abdominal fat by liposuction, hematopoietic stem cells are obtained from bone marrow of the patient by puncture of the iliac crest and the platelet rich plasma is obtained from blood. Prepare four petri dishes. One capsule will be a control with only pure adipose tissue, another with pure adipose tissue and mesenchymal stem cells, one with pure adipose tissue and hematopoietic cells and one with pure adipose tissue, both stem cells and growth factors by platelet rich plasma. We evaluate their differentiation into adipose tissue. **Results:** The result was satisfactory differentiation proving the stem cell to adult adipose tissue. Efficacy platelet was calculated satisfactorily and mesenchymal and hematopoietic stem cells too. **Conclusions:** The method is feasible and reproducible. Differentiation was evident in all proceedings to adult tissue. **Keywords:** PLATELET RICH PLASMA (PRP) – HEMATOPOIETIC STEM CELLS – MESENCHYMAL STEM CELLS – DIFFERENTIATION.

INTRODUCCION

Las células madre mesenquimales son células multipotentes, que están presentes en diferentes tipos de tejidos adultos como la médula, el tejido graso, entre otros⁽¹⁾. Las células madre mesenquimales pueden cultivarse y expandirse como células indiferenciadas y como tienen el potencial también pueden diferenciarse a linajes de tejidos mesenquimatosos, incluyendo hueso, cartílago, grasa, tendón, músculo, y estroma de médula ósea⁽²⁾.

Recientemente, las células madre pluripotentes han sido cultivadas a partir de tejido fetal humano y han mostrado la capacidad de dar lugar a una variedad de tipos diferenciados de células embrionarias que se encuentran en capas germinales⁽¹⁾. Muchos tejidos adultos contienen poblaciones de células madre que tienen la capacidad para renovarse después de un trauma, enfermedad o envejecimiento. Las células se pueden encontrar en varios tejidos que sirven como reservorios de células madre. Por ejemplo, aunque la médula ósea es la mayor fuente de células madre adultas hematopoyéticas que renuevan los elementos de la circulación sanguínea, estas células se pueden encontrar en otro tejidos⁽²⁾. La médula ósea de los adultos también contiene las células madre mesenquimales, que contribuyen a la regeneración de tejidos mesenquimales tales como hueso, cartílago, músculo, ligamento, tendón, tejido adiposo, y el estroma⁽³⁻⁵⁾. En el presente trabajo se tomara muestra de células Hematopoyéticas por aspirado de médula ósea de cresta ilíaca con ayuda del Servicio de Traumatología del Hospital Universitario de Caracas.

Estudios previos han identificado los criterios de selección para suero fetal bovino (FBS) que permite la expansión de una población de células de médula con potencial después de la implantación⁽⁵⁻¹¹⁾.

Planteamiento y delimitación del problema

En el campo de la cirugía plástica reconstructiva, el tratamiento de múltiples defectos se realiza con la grasa autóloga del paciente o con materiales sintéticos

que han sido usados como relleno, para “reemplazar parecido con parecido”⁽⁸⁾; los materiales como parafina, goma, látex y silicón fueron utilizados a comienzos de los años noventa para rellenar tejidos blandos^(9,10). Hoy en día, algunos de ellos se han modificado permaneciendo en el mercado mientras que otros han caído en desuso; recientemente rellenos más sofisticados y biológicamente compatibles han sido introducidos como por ejemplo el ácido hialurónico^(9,11).

Aunque estas macromoléculas son utilizadas en la actualidad como rellenos de partes blandas, también pueden ser empleadas para regeneración tisular actuando como soporte o matriz, al ser incorporadas a diversos tipos celulares como adipocitos o fibroblastos dérmicos produciendo aumento de volumen⁽¹²⁾.

El tejido adiposo está formado por: adipocitos, sean uniloculares (blancos) o pluriloculares (pardo). Los adipocitos son células especializadas en el acúmulo de grasas. El otro componente del tejido graso es el estroma que es el soporte de los adipocitos mediante el tejido conjuntivo reticular, la vascularización y la innervación del sistema nervioso autónomo (SNA)⁽¹²⁾.

El tejido adiposo puede ser unilocular (tejido adiposo blanco) que se encarga del almacén energético y la regulación de la energía disponible para el organismo: liposíntesis y lipólisis. La composición bioquímica del tejido adiposo unilocular es 90% triglicéridos, ácidos grasos libres, colesterol, fosfolípidos y lipocromos⁽¹³⁻¹⁶⁾.

Considerando la incidencia de obesidad en la población actual, ésta es una fuente realmente abundante y accesible. El tejido adiposo puede ser obtenido mediante lipoaspiración en grandes cantidades y con riesgo mínimo. La lipoaspiración es el 3° procedimiento que con mayor frecuencia realizan los cirujanos plásticos en nuestro País. Con anestesia local se pueden obtener hasta 200 g de tejido. 1 g de tejido adiposo contiene 5×10^7 Células madre, aproximadamente 500 veces más que 1 g medula ósea⁽¹³⁾. En el estudio la cual muestra será tomada por residentes del 3er año de Cirugía Plástica, Reconstructiva y Maxilofacial del Hospital Universitario de Caracas por lipoaspiración abdominal.

Uno de los objetivos de la medicina ha sido reestablecer la anatomía y función normal de órganos luego de algún tipo de lesión, de acuerdo a esto se ha trabajado en profundizar los conocimientos sobre regeneración tisular y se ha observado que algunos organismos pueden regenerar sus órganos como un proceso habitual ⁽¹³⁾.

En la especie humana solo el hígado puede regenerarse recuperando su tamaño y función inicial luego de una resección, el resto de los órganos incluyendo la piel no pueden regenerarse por completo.

La medicina regenerativa tiene como objetivo perfeccionar la reparación tisular y llegar a regenerar tejidos combinando el estudio de factores de crecimiento, células madre mesenquimales y hematopoyéticas.

Por lo anteriormente expuesto y la ausencia de información en nuestro país y solo estudios experimentales a nivel mundial, de éstos procesos regenerativos, en el área de la Cirugía Plástica, se plantea el siguiente problema: ¿es posible perfeccionar y mejorar la reparación tisular y llegar a regenerar tejidos a partir de células madre mesenquimales, hematopoyéticas y plasma rico en plaquetas en el Servicio de Cirugía Plástica, Reconstructiva y Maxilofacial del Hospital Universitario de Caracas – Venezuela, enero-octubre 2012?.

Importancia y justificación del Problema

En base a los anteriormente descrito, planteamos la diferenciación de células madre mesenquimales derivadas de adipocito, células madre hematopoyéticas derivadas de médula ósea y la combinación de ambas con plasma rico en plaquetas en tejido adiposo in vitro (adipocitos), comparando su evolución y desarrollo desde la célula primitiva, su crecimiento hasta el tejido adulto adiposo. Las células madre mesenquimales han recibido gran interés por su capacidad de auto-replicación y multipotencialidad para su uso clínico⁽¹⁵⁾. Se ha demostrado que las Células madre mesenquimales crecían como focos de células, con morfología semejante a fibroblastos denominados: unidades de fibroblastos formadoras de colonias. Con base en dicha característica y a su particularidad de adherirse a

frascos de cultivos plásticos es que en este experimento se estudiaron diferentes medios de cultivo. Por lo tanto, se determinará cuál medio de cultivo sería el más eficiente para lograr la proliferación celular en el menor tiempo posible, en pro de ser utilizado potencialmente como regeneradores tisulares.

El uso de las células madre (SCs, *Stem Cells*) representa una opción innovadora y prometedora para resolver muchos de los problemas clínicos en el área de la Cirugía Plástica Reconstructiva, asegurando un suficiente número de células específicas del tejido, eliminando la morbilidad del sitio donante y los problemas de rechazo inmunológico ^[6-7]. Estas células han generado oportunidades significativas para la ingeniería de injertos adecuados para la regeneración de tejidos. Las SCs están definidas como poblaciones celulares que tienen la capacidad de autorenovarse y diferenciarse en uno o más tipos de linajes especializados ^[8]. El estudio sobre las SCs ha creado un interés en el área de Cirugía Plástica y en el Servicio del Hospital Universitario de Caracas para explorar la regulación de los procesos de diferenciación celular desde las células más primitivas hacia las células completamente diferenciadas como las de tejido adiposo.

Actualmente, Venezuela cuenta con un banco de células madres y la UTC del IVIC, el cual prestó apoyo para la realización del marco teórico del presente estudio; institución creada recientemente, juega un papel importante, motivado por la posición de vanguardia que representa Venezuela en el panorama terapéutico que simbolizan las células madres.

Antecedentes

Neuber fué el primero en publicar los hallazgos obtenidos al rellenar defectos corporales con el uso de grasa autóloga en 1893⁽¹³⁾, desafortunadamente, ha sido realmente usada en el campo de la cirugía plástica desde hace 15 a 20 años para reconstrucción corporal^(14,15). El elevado interés de este procedimiento ha sido paralelo al desarrollo y popularidad de la liposucción para el contorno corporal; una razón puede ser la tendencia natural de aprovechar la grasa removida para

aumentar o restaurar áreas corporales con pérdida de volumen o irregularidades de contorno que ocurren con la edad, enfermedades y/o traumatismos.

Las primeras células mesenquimales estudiadas han sido las obtenidas desde la médula ósea, la evidencia que muestra la existencia de estas células no-hematopoyéticas que podían diferenciarse en otras células mesenquimáticas, ha demostrado la potencialidad para diferenciarse en líneas celulares adipogénicas, osteogénicas, condrogénicas, miogénicas y neurogénicas *in vitro* ⁽¹⁶⁾, así como su potencialidad para ser utilizadas clínicamente con éxito para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares, esclerosis lateral amiotrófica y osteogénesis imperfecta ⁽¹⁷⁾. El problema que reviste la obtención desde la médula ósea es que es doloroso, requiere con frecuencia anestesia espinal y la concentración de MSCs obtenidas luego del proceso es baja, lo que necesita varios cultivos *in Vitro* para obtener un número útil, con el riesgo de contaminación y pérdida ⁽¹⁸⁾.

Actualmente se conoce la presencia de células troncales en varios otros tejidos, presentes ahí con el fin de mantener y reparar ⁽¹⁹⁾, se ubican en el tejido conectivo principalmente de órganos de origen mesodérmico. Por este hecho se ha identificado el tejido adiposo como fuente ideal, ya que permite obtener de forma fácil, con mínimo discomfort para el paciente un gran número de células que pueden proliferar en cultivo ⁽²⁰⁾. A las células troncales obtenidas del tejido adiposo las denominaremos ASCs (Adipose-derived Stem Cells).

Los cirujanos plásticos más familiarizados con procedimientos de relleno con grasa han reportado buenos resultados clínicos sugiriendo la persistencia a corto y largo tiempo y promoviendo la grasa autóloga como relleno ideal⁽¹⁹⁻²²⁾, es económica, fácilmente disponible, es autóloga lo que lleva a ausencia de respuesta inmune del huésped, es segura, y fácilmente obtenida con un procedimiento mínimamente invasivo⁽¹⁵⁾.

Durante el procesamiento de la muestra es un paso importante el tratamiento de la misma mediante la centrifugación o sedimentación y lavado. La importancia de la centrifugación o el lavado se centra en remover componentes no viables de la

grasa aspirada como sangre, aceite y lidocaína, obteniendo tres líneas claramente definidas; a saber, la grasa en una línea superior de aceite de lipocitos rotos, una línea media de grasa utilizable y una línea inferior de tanto sangre como solución tumescente^(19,24,33,34). El lavado de la grasa obtenida ha ofrecido varias ventajas como aumentar el porcentaje de sobrevivencia celular, el beneficio de la eliminación de mediadores inflamatorios, resultando en una reducción de la respuesta inmune en el sitio receptor⁽¹⁵⁾. Sin embargo, no existe un consenso con relación a la centrifugación o lavado a nivel mundial.

En múltiples estudios se ha demostrado que representa un problema clínico de gran importancia la limitada y variable longevidad de la grasa autóloga así como la disminución significativa de su volumen con el tiempo^(15,16).

El otro tipo de tejido adiposo existente es el plurilocular (tejido adiposo pardo), que se encarga del aislamiento térmico mediante el panículo adiposo realizando la termogénesis, la protección mecánica como lo son las almohadillas plantares y la grasa retroperitoneal. Tipos de tejido adiposo de vertebrados⁽¹⁷⁾.

El tejido adiposo unilocular (blanco) se evidencia al microscopio como una sola gota de grasa en cada adipocito y el tejido adiposo plurilocular (pardo) se visualiza al microscopio como muchas gotas de grasa en cada adipocito⁽¹⁹⁻²⁵⁾.

En estudios recientes, se ha demostrado que por combinación de terapia de células madre con transferencia grasa, la supervivencia tisular puede ser potencialmente mejorada, debido a que las primeras pueden facilitar la angiogénesis y minimizar la respuesta inflamatoria⁽⁹⁾. Las células madre representan hoy en día la clave de la medicina regenerativa la cual se basa en el uso de materia prima –células, matriz y/o componentes químicos- del cuerpo para reparar y restaurar naturalmente la apariencia o función; su aplicación se ha descrito tanto en enfermedades como en procedimientos estéticos y reconstructivos. En muchos casos, las células son el miembro más crítico de esta tríada regenerativa; las cuales, a diferencia de otras moléculas, no pueden ser manufacturadas, debiendo ser aisladas, purificadas y algunas veces replicadas

antes de su uso clínico; este proceso debe ser realizado de manera tal que el potencial terapéutico de las mismas no sea disipado o removido simultáneamente⁽³⁸⁾. Es por esto que las células madre han recibido atención significativa como fuente ideal de células en base a su multipotencialidad; capaces de regenerarse y replicarse⁽⁹⁾. Éstas últimas llamadas células madre derivadas de adipocitos humanos⁽⁴⁰⁾.

Marco teórico

Por definición una célula troncal se caracteriza por su habilidad de auto renovarse y diferenciarse en múltiples líneas celulares. Las alternativas de células troncales disponibles son: células troncales embriónicas (Embryonic Stem Cells, ESCs) y células troncales adultas. Aunque el potencial terapéutico de las ESCs parece enorme debido a su gran capacidad de renovación y pluripotencialidad, hay limitaciones prácticas y éticas en su utilización. A diferencia del tipo adulto que es posible de obtener de varios tejidos ya desarrollados no posee tales limitaciones, a este tipo se les denomina células troncales mesenquimales (Mesenchymal Stem Cells, MSCs).⁽¹⁶⁾

Las MSCs corresponden a células de origen mesodérmico, se les considera multipotenciales con autorrenovación limitada y con capacidad de dar origen a tejidos de la misma capa embrionaria, aunque debido a las publicaciones actuales que muestran diferenciación a tejidos de otro origen embrionario podrían pasar a la categoría de pluripotenciales.⁽¹⁶⁾

El tejido adiposo posee la habilidad de cambiar de volumen durante la vida de un individuo, los cambios menores son por hipertrofia celular, pero los cambios mayores son mediados por hiperplasia y aumento de la vascularización. Estos cambios están mediados por una población de células troncales multipotentes con propiedades similares a las obtenidas desde la médula ósea.⁽¹⁷⁾

Según ⁽¹⁹⁾ (2007) para que las células troncales puedan ser utilizadas con fines médicos deben cumplir con los siguientes criterios:

1. Presencia en cantidades muy abundantes (millones a billones de células)
2. Aislables con procedimientos mínimamente invasivos.
3. Diferenciables en múltiples linajes celulares de manera regulable y reproducible.
4. Trasplantables en forma autóloga o alógena.
5. Manipulables de acuerdo a las actuales Guías de Buena Práctica.

Considerando la incidencia de obesidad en la población actual, esta es una fuente realmente abundante y accesible. El tejido adiposo puede ser obtenido mediante lipoaspiración en grandes cantidades y con riesgo mínimo. La lipoaspiración es el 3° procedimiento que con mayor frecuencia realizan los cirujanos plásticos en nuestro País (ASPS 2007). Con anestesia local se pueden obtener hasta 200 g de tejido. 1 g de tejido adiposo contiene 5×10^7 ASCs, aproximadamente 500 veces más que 1 g médula ósea.⁽¹⁸⁾

Tomando en cuenta los riesgos de este procedimiento, ya que en la liposucción aislada no llegan al 0.5 % cuando se combina con otra cirugía (Ej: histerectomía, abdominoplastia) se acerca al 1%. Estos riesgos se clasifican en: Estéticas y Médico-quirúrgicas. Las primeras incluyen: pigmentación post-inflamatoria (es la más frecuente y se resuelve con los métodos convencionales de despigmentación), irregularidades, (que pueden retocarse con pequeñísimas cánulas) y arrugas (cuando se extraen grandes volúmenes o la piel tiene estrías). También tenemos dermatitis de contacto por el French Tape (R) que mejoran al retirar el mismo.

Las complicaciones quirúrgicas son muy raras si se usa adecuada asepsia y preparación preoperatoria, se limita el volumen extraído y se moviliza tempranamente al paciente. El riesgo de shock hipovolémico, perforación, embolia grasa y enormes equimosis prácticamente han desaparecido con el uso de la técnica tumescente de Klein.

Consideraciones del tejido adiposo: El tejido adiposo deriva de la capa mesodérmica del embrión y tiene desarrollo pre y post natal. La formación de células adiposas en la especie humana tiene lugar durante el segundo trimestre de gestación ⁽¹⁶⁾. 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 vacuolas lipídicas. Su diferenciación celular procede de la secuencia adipoblasto - preadipocito - adipocito inmaduro - adipocito maduro. En el tejido adiposo los precursores coexisten en conjunto con células adiposas maduras, fibroblastos, células sanguíneas, células endoteliales, pericitos y células mesenquimales indiferenciadas y pobremente diferenciadas, que hoy llamamos MSCs.

Diferenciación Adipogénica: Las ASCs poseen la capacidad de diferenciarse en linaje adiposo con todas sus características funcionales tales como actividad lipolítica ante la estimulación con catecolaminas, secreción de adiponectina y leptina ⁽¹⁹⁾. Se ha regenerado nuevo tejido adiposo en ratas mediante la inyección de esferas que incluyen ASCs diferenciadas. El futuro de la regeneración de tejido adiposo será restituir la morfología de partes blandas.

Las células madre son una herramienta regenerativa que beneficia variedad de tratamientos médicos, entre ellos existen altas expectativas en la reconstrucción de defectos anatómicos. Las células madre se pueden clasificar según su potencial de diferenciación: totipotenciales capaces de producir tejido embrionario y extraembrionario; pluripotenciales con la habilidad de diferenciarse a tejidos procedentes de cualquiera de las tres capas embrionarias y, por último, las células madre multipotenciales capaces de diferenciarse a distintos tipos celulares procedentes de la misma capa embrionaria⁽⁴⁰⁾.

La médula ósea contiene 0,01% de células madre, mientras que la grasa corporal contiene 5% de células madre mesenquimales. Para obtener cantidades iguales

de células madre presentes en 1 gramo de tejido adiposo se necesitan 500 gramos de médula ósea, considerando de esta manera muestra necesaria para llevar a cabo el presente estudio; en un paciente previo consentimiento informado. Este tejido es capaz de producir al menos 5 veces más unidades formadoras de colonias que la médula ósea⁽⁴¹⁾. Se considera que, de 1 gr. de tejido adiposo, se pueden obtener 5×10^7 CM, lo que supone una cantidad mayor de células de las que se obtienen de la médula ósea⁽⁴¹⁾.

Las células madre hematopoyéticas son células multipotenciales en la médula ósea y en la sangre periférica, dando lugar a tejidos derivados de distintas capas embrionarias. Las células madre hematopoyéticas de médula ósea y de sangre periférica son capaces de contribuir a la angiogénesis y vasculogénesis *in vivo* de tal forma que las células CD34+ no sólo contienen progenitores hematopoyéticos sino también células progenitoras endoteliales⁽⁴²⁾.

Hoy en día se acepta que existe un progenitor común endotelial y hematopoyético (hemangioblasto), lo cual vendría apoyado por estos hallazgos de la potencialidad endotelial de las células troncales hematopoyéticas de la médula ósea⁽⁴²⁾.

Las células madre mesenquimales poseen gran capacidad de proliferación y diferenciación con un alto valor terapéutico. El tejido graso es un reservorio accesible, abundante y reponible importante de células mesenquimales capaces de cultivarse, expandirse y diferenciarse en diferentes líneas celulares como adipocitos, osteocitos y miocitos⁽⁴⁰⁻⁴³⁾.

El tejido adiposo derivado de células madre, se toma como fuente de origen de células adultas de fracción adipocita estromal extraída mediante liposucción. Las células madre se pueden identificar mediante la tinción con azul tripano ó mediante marcadores de superficie como: CD34-, CD90+, CD73+, CD79-, entre otros⁽⁴³⁾.

Los sitios más comunes para la obtención de grasa incluyen pared abdominal, extremidades, área trocantérica, rodilla interna y grasa dorso-cervical⁽²⁴⁾. La comparación entre las diferentes áreas donantes de liposucción, muestran un

rendimiento 22% más alto para las células de la fracción adipocita estromal cuando el tejido adiposo había sido obtenido del tronco, en comparación a cuando lo había sido de los miembros⁽⁴³⁾.

Las propiedades metabólicas de las células madre derivadas de adipocitos son angiogénicas, antioxidativas e inmunotolerancia. Las células madre derivadas de adipocitos humanos contienen grandes cantidades de factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), factor de crecimiento B, factor de crecimiento del hepatocito, factor de crecimiento derivado de plaquetas, por lo cual se puede explicar sus impresionantes capacidades angiogénicas y su habilidad para la inducción de neovascularización tisular^(41,42).

Las células madre derivadas de adipocitos humanos inhibe la producción de citoquinas inflamatorias. Estas propiedades inmunomoduladoras han sido demostradas in vitro e in vivo⁽⁴⁰⁻⁴³⁾.

Actualmente, existe un alto interés científico y clínico alrededor del potencial de las células madre autólogas en el tratamiento de un amplio rango de condiciones^(39,40). Muchas fuentes de células han sido identificadas, incluyendo médula ósea, grasa, músculo, hígado, piel, corazón y cerebro en el adulto; adicionalmente existen fuentes fetales y embriogénicas. La médula ósea, por ejemplo, ha demostrado contener una población de células madres con potencial regenerativo capaces de soportar la reparación y regeneración de hueso, cartílago adipocitos, corazón e incluso neuronas^(15,38,39).

Se ha utilizado las células madre en el aumento de tejido blando, tomadas de la fracción adipocita estromal. Se tiene de antecedente la inyección de células madre derivadas de adipocitos humanos en cicatrices deprimidas y el volumen de cada una de las cicatrices deprimidas fue medido con scans tridimensionales⁽⁴²⁾. Ellos observaron un 74,6% de volumen recuperado en el defecto después de 1 año de tratado, resultando una nueva y efectiva terapéutica para aumento de tejido blando^(41,42). En cuanto a los trabajos realizados con el uso de células madre

tenemos también varios que lo trabajan en lipodistrofia y en reconstrucciones mamarias⁽⁴²⁾.

Diversos autores se oponen a la adición de químicos, hormonas, drogas o sustancias extrañas de cualquier tipo, enfatizando la importancia de prevenir el daño químico o mecánico de los delicados tejidos grasos^(17,26,30,35,36), a pesar del elevado interés científico en usar factores de crecimiento para aumentar la viabilidad grasa, parece existir poca evidencia clínica para adoptar tal medida. Sin embargo se ha encontrado una reducción de la reacción inflamatoria local e incremento en la sobrevida de la grasa autóloga suplementada con plasma rico en plaquetas, que ha ganado popularidad como tratamiento clínico en una variedad de aplicaciones en casi todos los campos quirúrgicos, más notablemente en condiciones quirúrgicas agudas y en el manejo de heridas crónicas no cicatrizadas. Como resultado de la obtención del plasma rico en plaquetas puede obtenerse una concentración plaquetaria de cuatro a nueve veces el nivel basal de plaquetas, aproximadamente de 300% a 800% de aumento; siendo definido como el objetivo clínico del procedimiento el alcanzar más de un millón de plaquetas; las cuales son ricas en factores de crecimiento del huésped como PDGF-BB, TGF-1, VEGF y EGF³⁷, con el consecuente beneficio en la promoción de la cicatrización de heridas.

El método tradicional de obtención de plasma rico en plaquetas consiste en obtener una muestra de sangre periférica del paciente que es depositada en tubos citratados. Posteriormente se centrifuga la sangre obteniéndose tres fracciones, de menor a mayor densidad: plasma pobre en plaquetas, plasma rico en plaquetas y células rojas. La estrategia de utilizar el plasma rico en plaquetas se basa en las siguientes razones; por un lado funcionan como vehículo portador de factores de crecimiento y de otras proteínas, controlando la liberación de estas que se encuentran contenidas en los gránulos alfa de las plaquetas, siendo concentradas y depositadas en el lugar que han sido colocadas, exponiendo y orientando un concentrado fisiológico de proteínas que va a intervenir, acelerando y favoreciendo el proceso de reparación y regeneración.

Las células madre tienen dos propiedades básicas, primero, tienen el potencial de desarrollarse o diferenciarse en múltiples tipos celulares; segundo, cuando se dividen tienen el potencial de auto regenerarse creando más células madre¹⁵. En el futuro inmediato, las células madre adultas representarán la fuente más prometedora regenerativa de células en cirugía plástica.

En base a los antecedentes descritos, nos hemos planteado la diferenciación de células madre mesenquimales derivadas de adipocito, células madre hematopoyéticas derivadas de médula ósea y la combinación de ambas con plasma rico en plaquetas en tejido adiposo in vitro (adipocitos), comparando su evolución y desarrollo desde célula primitiva, su crecimiento hasta tejido adulto adiposo.

Hipótesis:

Planteamos la siguiente hipótesis: El tejido adiposo y la médula ósea, contienen células madre mesenquimales capaces de diferenciarse en una línea celular específica como el tejido adiposo.

Objetivo general:

Evaluar la diferenciación y transformación del tejido adiposo con células madre mesenquimales, células madre hematopoyéticas y ambos tipos de células madre junto con factores de crecimiento (plasma rico en plaquetas) en una línea celular específica como es el tejido adiposo, así como medir el tiempo en que ocurre esa diferenciación, en la Unidad de Cirugía Plástica, Estética, Reconstructiva y Maxilofacial del Hospital Universitario de Caracas enero-octubre 2012.

Objetivos específicos:

1. Obtener y calcular células madre mesenquimales de tejido adiposo adulto humano a través de liposucción abdominal, en los quirófanos del Hospital Universitario de Caracas en el intervalo de tiempo establecido.
2. Obtener y calcular células madre mesenquimales y hematopoyéticas de tejido de médula ósea humana a través de punción biopsia de la cresta

ilíaca, en los quirófanos del Hospital Universitario de Caracas en el intervalo de tiempo establecido.

3. Identificar gel de plasma rico en plaquetas a partir de la sangre periférica humana, en los quirófanos del Hospital Universitario de Caracas.
4. Desarrollar tejido adiposo unilocular o plurilocular a partir de diferentes componentes in vitro.
5. Determinar viabilidad de diferenciación de las células madre en tejido adiposo junto con factores de crecimiento o sin ellos, así como medir el tiempo en que ocurre esa transformación.

Aspectos éticos:

Las pacientes incluidas en este trabajo son escogidas al azar en la lista de pacientes que por deseo propio acuden al servicio de Cirugía Plástica del HUC para la realización de una cirugía estética. Se les explicará a las pacientes que no tendrán ningún riesgo sumado por la inclusión en el trabajo ya que la toma de las muestras es basada en el mismo procedimiento estético que se les realizará.

A las pacientes incluidas en el trabajo se les explicará el procedimiento, los riesgos médico-quirúrgicos propios de la cirugía, las características del trabajo y su derecho a decidir la inclusión o exclusión del mismo, que su identidad no será expuesta, ni tendrá consecuencias individuales indeseables, además su participación en el estudio no implica la sectorización de estatus social de las pacientes, raza o religión, todo esto avalado por la firma de un consentimiento informado, como requisito indispensable para la inclusión de los pacientes en este trabajo.

En cuanto al procedimiento in vitro, no tiene ningún problema bioético, ya q es experimental usando tejidos de pacientes que firmaron el consentimiento informado para el uso de los mismos y los cuales serán destruidos al finalizar el trabajo de investigación. No serán usados para ningún fin.

MÉTODOS

Tipo de estudio:

El estudio será de tipo experimental, prospectivo porque se realizará en la misma línea de tiempo que sucedan los hechos, descriptivo ya que determinará las variables a estudiar descritas y comparativo porque relacionará cada una de estas variables experimentalmente entre ellas en los diferentes procedimientos a realizar.

Población y muestra:

Al ser un estudio de tipo experimental se describe como población a las Células madre mesenquimales, hematopoyéticas y el plasma rico en plaquetas. La muestra serán las Células madre mesenquimales, hematopoyéticas y el plasma rico en plaquetas obtenidas de 2 pacientes femeninas que serán sometidas al procedimiento de liposucción estética por deseo propio de las pacientes, realizadas por residentes del tercer año del Servicio de Cirugía Plástica del HUC y previo consentimiento informado, mediante el cuál nos permitirán tomar muestras para la realización del estudio. Siendo esta muestra suficiente para obtener 1 g de tejido adiposo que contiene 5×10^7 Células madre, aproximadamente 500 veces más que 1 g medula ósea y su preparación y distribución en cuatro placas de petri: Una cápsula va a ser el control con solo tejido adiposo puro, una va a ser la cápsula de petri con tejido adiposo puro y células madres mesenquimales derivadas de adipocitos humanos, otra cápsula de petri con tejido adiposo puro y células hematopoyéticas obtenidas de médula ósea de cresta ilíaca y otra cápsula de petri con tejido adiposo puro con ambas células madre y factores de crecimiento por medio del plasma rico en plaquetas.

Criterios de Inclusión Generales:

- Pacientes mayores de 18 años.
- Pacientes que firmen el consentimiento informado.
- Pacientes sanos.

Criterios de Exclusión Generales:

- Pacientes menores de 18 años.
- Pacientes que no firmen el consentimiento informado.
- Se excluyeron del mismo aquellos pacientes mayores de 65 años, en tratamiento con citostáticos o corticoides, con historia de alcoholismo, presencia de lesiones dérmicas activas, radioterapia previa afectando a pelvis, infección activa, anemia ($Hb < 10,0$ gr/dL), leucopenia ($leucocitos < 4.000/mm^3$) o procesos tumorales activos.

Procedimiento:

Las células madre mesenquimales son obtenidas de grasa abdominal de 2 pacientes por medio de liposucción estética por deseo de las pacientes, realizadas por residentes del tercer año del Servicio de Cirugía Plástica del HUC, las células madre hematopoyéticas son obtenidas de la médula ósea de las pacientes mediante punción de la cresta ilíaca, realizadas por el Servicio de Traumatología del HUC y el plasma rico en plaquetas es obtenido de la sangre periférica, tomadas por residentes del tercer año del Servicio de Cirugía Plástica del HUC.

Recursos Humanos:

Área de la Unidad de Cirugía Plástica, Reconstructiva, Estética y Maxilo-Facial, Quirófanos del Hospital Universitario de Caracas, Laboratorio de Microbiología y el Servicio de Perinatología del Hospital Universitario de Caracas, así como el asesor estadístico.

Con asesoría teórica del banco de células madres y la UTC del IVIC, Dr. Cardier.

Asistencia del Servicio de Traumatología del Hospital Universitario de Caracas en la toma de muestra de cresta iliaca.

Materiales:

- Solución de infiltración preparada con 500 cc de solución Ringer Lactato, 50 cc de lidocaína al 1% y 1 ampolla de adrenalina.
- Bisturí número 15, suturas dermalon 4.0.

- Inyectadoras de 3cc, aguja N°26 y pipetas.
- Guantes, gasas y campos quirúrgicos.
- Cápsulas de petri, láminas y laminillas
- Solución salina de buffer fosfatado
- Cultivo Dulbecco Medium Eagle Modified.
- Suero Bovino, Colagenasa tipo IV, insulina y dexametasona.
- Antibiótico (penicilina) y antimicótico (anfotericina)
- Tinte Azul Tripano, agua destilada, Bicarbonato sódico.
- Gluconato de calcio al 10% y Cifarcaína al 1%
- Tubos de ensayo recolección de sangre estériles tapa morada con capacidad de 4 cc y contenido de EDTA (Acido etilen-diamino-tetra-acético) 7,2 mg BD vacutainer® y tubos de ensayo de recolección de sangre estériles de tapa roja marca Vacutainer capacidad 6ml.
- Centrífuga Plc® Series.
- Incubadora: ambiente 37°C con 20% O₂, 5% CO₂ y 98% humedad.
- Microscopio
- Inyectadoras de 20 y 60 cc tipo BD y pipetas
- Cánula de infiltración y cánulas de aspiración de 3 y 4 mm.
- Set Biopsia de Médula Ósea de Hs Hospital Service®.
- Microscopio
- Laptop HP.
- Internet

- Artículos de revisión bibliográfica.
- Libros de estadística.

Financiamiento: Propio

Con fines descriptivos, hemos dividido la técnica quirúrgica en la marcación preoperatoria seguida de un tiempo destinado a la obtención de cada uno de los componentes, como se muestra a continuación.

Marcación Preoperatoria: El paso inicial consistirá en seleccionar la zona donante de grasa, en este caso el abdomen y los sitios de referencia anatómica para la punción de médula ósea.

Primer Tiempo: Lipoaspiración, procesamiento de grasa y obtención de células madre mesenquimales: El procedimiento se realizará bajo anestesia general inhalatoria, con normas de asepsia y antisepsia más administración de antibioticoterapia profiláctica durante la inducción anestesia. Se iniciará posicionando el paciente en decúbito dorsal e infiltrando el abdomen con la solución previamente descrita a través de cánulas introducidas por dos incisiones suprapúbicas y dejando pasar diez minutos con objeto de otorgar mayor hemostasia por efecto de la adrenalina; posteriormente se realizará la lipoaspiración con cánulas de tres y cuatro milímetros conectadas a inyectoras de 60 cc, obteniendo el total de lipoaspirado total. Procedimiento se realizara por residentes del 3er año del postgrado de Cirugía Plástica, Reconstructiva y Maxilofacial del Hospital Universitario de Caracas. En conjunto con los adjuntos del servicio.

La grasa obtenida será repartida en tubos de ensayo de recolección de sangre estériles tapa morada Vacutainer® separándola de la solución de infiltración repartiéndose en proporción de 4 cc de grasa por cada tubo. La grasa, dispuesta de esta manera, será llevada a la Centrífuga Plc® a 1500 revoluciones por minuto durante cinco minutos para obtener tres líneas claramente definidas, a saber, una línea superior similar a la grasa líquida conformada por adipocitos fracturados, una

línea media de tejido graso útil y una línea inferior de sangre y solución tumescente. Mediante la ayuda de pipetas será descartada la línea oleosa superior y aislada la línea media a utilizar durante el resto del procedimiento. La muestra estéril será colocada en el medio de cultivo previamente preparado en un ambiente estéril en quirófano.

Se preparará el medio de cultivo llamado “Dulbecco Medium Eagle Modified” (DMEM) con una bolsa para 500cc de medio de cultivo. En 500 cc de agua destilada, se colocará el sobre del medio de cultivo en polvo y se añade 3,7 gramos de NaHCO_3 por litro del medio de cultivo. En vista que son 500cc se le añadirá 1,85 gramos de NaHCO_3 . Se le añade también 10% de suero Bovino Fetal y 1 % de preparación de antibiótico-antimicótico (penicilina-anfotericina).

Posteriormente la grasa será escindida, picada finamente y se incubará en placas de petri de 100mm^2 con cultivo de tejido Dulbecco Medium Eagle Modified (DMEM) por una hora. Luego el tejido se lavará 3 veces con solución salina de buffer fosfatado durante 5 minutos, seguido por la digestión con colagenasa al 0,15% preparada previamente. Se agitará durante 40 minutos a 37°C y se añadirá un volumen igual del DMEM para neutralizar la digestión por la colagenasa. Luego se realizará la suspensión celular mediante la centrifugación del DMEM a 1300 rpm durante 5 min. La parte superior centrifugada es el tejido graso de base que será colocado en las placas de petri con el cultivo. El sedimento celular se resuspenderá nuevamente en el DMEM, se pipetea por 5 minutos y se preserva para el aislamiento y el cultivo de células madre mesenquimales derivadas de adipocitos humana. Se realizará el conteo de las células madre mesenquimales usando el tinte de azul tripano con una pequeña muestra en las laminas y laminillas en ese mismo momento.

Segundo Tiempo: Preparación de Plasma Rico en Plaquetas (PRP): A través de una vena periférica se obtendrán 60 cc de sangre realizado por residentes de tercer año del Servicio de Cirugía Plástica del HUC, que se dispondrán en tubos de ensayo de recolección de sangre estériles tapa morada Vacutainer® en

proporción de 4 cc sangre por tubo, se llevarán a la centrífuga Plc a 3200[®] revoluciones por minuto durante quince minutos, se obtendrá el Plasma Rico en Plaquetas (PRP) que se mezclará con gluconato de calcio a razón de 0,05 cc por cada cc de PRP para conseguir la activación plaquetaria. También se tomarán 5cc de la sangre periférica y se colocarán en un tubo tapa roja, se centrifugará a 1.200 rpm por 5 minutos, para poder utilizar esa trombina que sale de la centrifugación junto con el gluconato de calcio para la activación las plaquetas. Serán tomadas muestras de sangre periférica y de plasma rico en plaquetas para validar la concentración plaquetaria comparativamente, analizadas en el laboratorio clínico del Hospital Universitario de Caracas.

Tercer Tiempo: Obtención de Células Madre Hematopoyéticas: Posicionando a la paciente en decúbito lateral, bajo la correcta asepsia y antisepsia, se procederá a realizar la punción de cresta ilíaca según marcaje preoperatorio con la ayuda de Set Biopsia de Medula Osea HS Hospital Service[®], y se tomará la muestra con ayuda del servicio de Traumatología del Hospital Universitario de Caracas, siendo verificado con el amplificador de imágenes obteniendo el total de volumen sanguíneo de la médula ósea. Será tomada una muestra de 0,5 cc de médula ósea para ser enviada a citometría de flujo en el Hospital de Clínicas Caracas y realizar la cuantificación de células madres, mediante el conteo de las CD34+ que son los marcadores celulares de superficie para las Células madre hematopoyéticas.

Cuarto Tiempo: Preparación de placas de petri para la diferenciación de las células madres en adipocitos: En un ambiente estéril y bajo la asepsia adecuada, se prepararán cuatro placas de petri con el sobrenadante centrifugado de tejido adiposo puro. Se le añadirá el DMEM, insulina y dexametasona a las cuatro placas de petri. Una cápsula va a ser el control con solo tejido adiposo puro, una va a ser la cápsula de petri con tejido adiposo puro y células madres mesenquimales derivadas de adipocitos humanos, otra cápsula de petri con tejido adiposo puro y células hematopoyéticas obtenidas de médula ósea de cresta ilíaca

y otra cápsula de petri con tejido adiposo puro con ambas células madre y factores de crecimiento por medio del plasma rico en plaquetas.

Las cuatro placas de petri se mantendrán a 37°C en 5% de dióxido de carbono, ambiente húmedo en un 98% y 20% de oxígeno, en todo el período experimental. El medio se estudiará cada 3 días, cambiándose el medio de cultivo, se tomarán con pipeta muestras, se colocarán en láminas y laminillas, se teñirán con azul tripano y serán analizadas bajo el microscopio.

Al finalizar la investigación todo el material será descartado. No será utilizado para ningún fin.

Tratamiento estadístico propuesto:

Para el análisis de las variables se hará por distribución de frecuencias, en escala cualitativa mediante frecuencias relativas como porcentajes y por escala cuantitativa mediante tendencias centrales como promedio aritmético, mediana y modo. Se utilizarán también medidas de dispersión como desviación estándar con curva de gauss. También se utilizará para el análisis datos de asociación mediante coeficiente de correlación y/o coeficiente de regresión. Como instrumento se usará el software Excel.

RESULTADOS

El tiempo quirúrgico fue de 50 minutos; aún cuando la logística incluye diversos pasos, estos pueden ser realizados simultáneamente sin necesidad de postergar el procedimiento.

Primer Tiempo: Lipoaspiración, procesamiento de grasa y obtención de células madre mesenquimales:

Posterior a centrifugación de la grasa se tomo muestra de la porción media de los tubos de ensayo de recolección de sangre estériles tapa morada Vacutainer®, lo que se llama fracción adipocita estromal, la cual contiene las células madre mesenquimales provenientes de la grasa, conocidas también como células madre derivadas de adipocitos.

Esta muestra fue estudiada in vitro con coloración de azul tripano, vista al microscopio para evidenciar las células madre mesenquimales en la muestra. Se evidenció la presencia de gran cantidad células madre mesenquimales. Se obtuvo 320cc del lipoaspirado total, descartando la solución de infiltración se obtuvo 160 cc de grasa total. Se considera que de 1 gr. de tejido adiposo, se pueden obtener 5×10^7 CM, lo que nos dice que si se obtuvieron 160 gr de grasa en lipoaspirado aproximadamente serían 8×10^9 CM mesenquimales en total que se le colocaron a las 4 placas de petri.

Las células que tienen las características de células madre mesenquimales se visualizaron del tejido graso abdominal de 2 pacientes. Estas células muestran una monocapa in vitro. Estas células madre adultas pueden ser inducidas a diferenciarse exclusivamente en los linajes celulares como en este estudio a adipocito.

Segundo Tiempo: Preparación de Plasma Rico en Plaquetas (PRP):

Tras obtener una muestra de sangre periférica y una muestra de gel plaquetario se realizaron mediciones cuantitativas del total de plaquetas.

Se obtiene un valor de plaquetas en sangre total de las 2 pacientes: Paciente 1: 212×10^3 células, paciente 2: 294×10^3 células.

Se obtiene el valor de las plaquetas del plasma rico en gel de plaquetas de las 2 pacientes: Paciente 1 y 2: 830×10^3 células, 942×10^3 respectivamente.

Con estos valores nos es posible determinar la eficiencia plaquetaria según la fórmula que se aplica a continuación:

Eficiencia Plaquetaria

$$= \frac{\text{Contaje obtenido de plaquetas (x10}^3 \text{ uL)}}{\text{Contaje inicial de plaquetas (x10}^3 \text{ uL)}} \times (\text{Volumen sanguíneo extraído x } 10^4) \times 100$$

$$\text{Eficiencia Plaquetaria Paciente 1} = \frac{830 \times 10^3 \text{ uL}}{212 \times 10^3 \text{ uL}} \times (60 \times 100) \times 100 = 2.349.056$$

$$\text{Eficiencia Plaquetaria Paciente 2} = \frac{942 \times 10^3 \text{ uL}}{294 \times 10^3 \text{ uL}} \times (60 \times 100) \times 100 = 1.922.448$$

De esta manera podemos demostrar el cumplimiento de los objetivos teóricos del plasma rico en plaquetas, a saber:

- El valor de plaquetas debe ser de tres a nueve veces el nivel basal; en este caso fue de ocho veces el nivel basal.
- La cifra de plaquetas debe ser 300 a 800% la inicial, encontrando que esta cifra es en paciente 1: 1108% y paciente 2: 653%.
- El objetivo clínico de superar el millón de plaquetas fue duplicado.

Tercer Tiempo: Obtención de Células Madre Hematopoyéticas:

Para validar científicamente la presencia de células madre hematopoyéticas en el aspirado de médula ósea obtenido por punción de cresta ilíaca, se tomó una muestra del mismo para ser procesado mediante citometría de flujo obteniendo así la cuantificación de células CD34+ con un valor reportado de 403 células/uL y 87 células/uL, paciente 1 y 2 respectivamente a partir de lo cual realizamos cálculos

para determinar el número de células progenitoras hematopoyéticas colocadas al paciente.

- Volumen total de médula ósea **paciente 1** = 60 mL = 60.000 uL x 403 CM = 24.180.000 células madre.
- Volumen total de médula ósea **paciente 2** = 60 mL = 60.000 uL x 87 CM = 5.220.000 células madre.

De esta manera podemos conocer la presencia cuantitativa y cualitativa de las células madre hematopoyéticas colocadas en las cápsulas de petri.

Cuarto Tiempo: Preparación de placas de petri para la diferenciación de las células madres en adipocitos: Se evalúan las cuatro placas de petri de ambas pacientes.

Una cápsula va a ser el control con solo tejido adiposo puro, una va a ser la cápsula de petri con tejido adiposo puro y células madres mesenquimales derivadas de adipocitos humanos, otra cápsula de petri con tejido adiposo puro y células hematopoyéticas obtenidas de médula ósea de cresta ilíaca y otra cápsula de petri con tejido adiposo puro con ambas células madre y factores de crecimiento por medio del plasma rico en plaquetas.

Se tomaron con pipeta muestras, se colocaron en láminas y laminillas, se tiñeron con azul tripano y fueron analizadas bajo el microscopio.

La primera cápsula de petri, cuyo contenido es el tejido adiposo solo, se logró evidenciar histológicamente bajo visión directa microscópica a lo largo de todo el período de tiempo experimental la presencia de tejido adiposo unilocular (blanco), visualizándose las gotas lipídicas grandes y en poca cantidad, los adipocitos grandes con núcleo marginado poco visible y la presencia de estroma con su tejido conjuntivo reticular.

La segunda cápsula de petri, cuyo contenido es el tejido adiposo con células madre mesenquimales derivadas de adipocitos humanos, se logró evidenciar

histológicamente bajo visión microscópica directa el crecimiento de tejido adiposo unilocular (blanco) y de tejido adiposo plurilocular (pardo).

El tejido graso unilocular se observa con las gotas lipídicas grandes y en poca cantidad, los adipocitos grandes con núcleo marginado poco visible y la presencia de estroma con su tejido conjuntivo reticular.

El tejido graso plurilocular se observa con adipocitos de mediano tamaño, con dos ó más núcleos, citoplasma abundante y numerosas mitocondrias con numerosas inclusiones lipídicas, y la presencia de muchas gotas de grasa alrededor de los adipocito. Se evidencia también el tejido conjuntivo reticular.

La tercera cápsula de petri, cuyo contenido es el tejido adiposo con células madre hematopoyéticas derivadas de médula ósea de cresta ilíaca, se logró evidenciar histológicamente bajo visión microscópica directa el crecimiento de tejido adiposo plurilocular (pardo) y se evidenció la formación de vasos sanguíneos. Se observaron adipocitos de mediano tamaño, con dos ó más núcleos, citoplasma abundante y numerosas mitocondrias con numerosas inclusiones lipídicas, y la presencia de muchas gotas de grasa alrededor de los adipocito. Se evidencia también el tejido conjuntivo reticular. Los vasos sanguíneos se observaron con la presencia de la capa del endotelio y con sus componentes vasculares en su interior.

La cuarta cápsula de petri, cuyo contenido es el tejido adiposo con células madre hematopoyéticas derivadas de médula ósea de cresta ilíaca, células madre mesenquimales derivadas de adipocitos y plasma rico en plaquetas, se logró evidenciar histológicamente bajo visión microscópica directa el crecimiento de tejido adiposo unilocular (blanco) y plurilocular (pardo). Se evidenció la formación de vasos sanguíneos. Aquí se evidenció el proceso de la diferenciación celular mucho más rápido que en las otras tres cápsulas de petri y con los elementos estudiados de mayor tamaño en menor tiempo. Se evidenció también la presencia de células madre y su diferenciación a adipocito en el momento del suceso bajo visión microscópica.

DISCUSIÓN

Nosotros diferenciamos una población aislada homogénea de células mesenquimales humanas a partir de médula ósea tomada de la cresta ilíaca, de tejido graso tomado de el abdomen de las pacientes por medio de la liposucción y la unión de células madre mesenquimales derivadas de adipocitos con plasma rico en plaquetas.

Estas células mesenquimales expandidas se evaluaron con tinte de azul tripano en el microscopio y se evidenciaron subpoblaciones y diferenciación hacia tejido adiposo.

La diferenciación en adipocitos fue inducida en los cultivos expandidos de las células mesenquimales con la colocación de dexametasona e insulina.

La inducción fue evidente por la acumulación de lípidos ricos en vacuolas dentro de las células. Resultó que en un gran porcentaje las células visualizadas en los cultivos eran de este tipo de linaje celular, adipocitos. Las vacuolas lipídicas continuaron desarrollándose a través del tiempo y eventualmente llenaron el espacio celular. Posteriormente se diferenciaron en tejido adiposo unilocular (blanco) y plurilocular (pardo).

El cultivo de las células madre mesenquimales expandidas progresaron al linaje deseado, visualizado mediante la caracterización fenotípica y el análisis histológico. No había evidencia de múltiples linajes. Las células mesenquimales que se describen en este estudio el aislamiento y la expansión, así como observamos su capacidad para proliferar en cultivo y diferenciarse con una buena morfología celular en tejido adiposo in vitro.

El rol importante de las células madre en medicina regenerativa y en la rama reconstructiva y estética de la cirugía plástica es lo que se está trabajando e investigando actualmente. Esto es debido a que la obtención de las células madre cada vez es más viable y la evidencia de todas sus propiedades cada vez se pueden demostrar de mejor manera y con mayor amplitud.

CONCLUSIÓN

Estos experimentos demostraron que el aislamiento y la expansión de células madre mesenquimales in vitro pueden diferenciarse con un manejo controlado en múltiples linaje celulares. Con este estudio se demuestra la hipótesis de que el tejido adiposo y la médula ósea, contienen células madre mesenquimales capaces de diferenciarse en adipocitos.

Además se logró la diferenciación hacia tejido endotelial con el correspondiente crecimiento de vasos sanguíneos en el tejido conectivo evaluado.

Para una eficiente diferenciación celular en algún tipo de línea celular las condiciones requeridas son los nutrientes basales, la densidad celular, la organización espacial, las fuerzas mecánicas y los factores de crecimiento que tienen una profunda influencia en la diferenciación de células madre en adipocitos.

Las células madres descritas aquí tienen la capacidad de proliferar extensivamente, y mantener que la capacidad de diferenciarse en múltiples tipos de células in vitro, estableciendo su naturaleza como células madre.

RECOMENDACIONES

Implementar el uso de plasma rico en plaquetas y terapia con células madre como complementos en el arsenal terapéutico rutinario de la Cirugía Plástica y Reconstructiva, en especial durante el desarrollo de los cursos de postgrado; así como promover la dotación de la tecnología requerida para desarrollar dicho campo de investigación y poder realizar futuras investigaciones.

Realizar nuevos trabajos de investigación donde se cultive y se diferencie selectivamente el linaje celular con el cual se quiera trabajar, que proporcione una mayor comprensión de este importante progenitor de múltiples tipos de tejidos y el potencial terapéutico de nuevo enfoques para la restauración de tejido dañado o enfermo.

REFERENCIAS

1. Marx RE. Platelet Rich plasma: Evidence to support its use. J Oral Maxillofac Surg. 2004; 62: 489-496.
2. Heldin CH, Bengt W. Mechanism of Action and In Vivo Role of Platelet Derived Growth Factor. Physiol Rev. 1999; 79(4):1283-1316.
3. Brown GL, Nanney LB, Griffin J. Enhancement of wound healing by topical treatment with epidermal growth factor. N Engl J Med. 1989; 321: 76-9.
4. Brown GL, Curtsinger L, Jurkiewicz MD y col. Stimulation of healing chronic wounds by epidermal growth factor. Plas Reconstr Surg. 1991; 88: 189-96.
5. Barry E, Woodell J, Higgins P. Platelet Quantification and Growth Factor Analysis from Platelet-Rich Plasma: Implications for Wound Healing. Plas Reconstr Surg. 2004; 113(6): 1502-1508.
6. Giacco F, Perruolo G, D'Agostino E y col. Thrombin-activated platelets induce proliferation of human skin fibroblasts by stimulating autocrine production of insuline-like growth factor-1. The FASEB Journal. 2006; 20, E1763-2404.
7. Blanton M, Hadad I, Johnstone B y col. Adipose Stromal Cells and Platelet Rich Plasma Therapies Synergistically Increase Revascularization during Wound Healing. Plas Reconstr Surg 2009; 123 (2S): 56-64.
8. Uebel CO, da Silva JB, Cantarelli D y col. The Role of Platelet Plasma Growth Factors in Male Pattern Baldness Surgery. Plas Reconstr Surg 2006; 118 (6): 1458-1465.
9. Dougherty EJ. An Evidence- Based Model comparing the Cost-Effectiveness of Platelet Rich Plasma Gel to Alternative Therapies for patients with Nonhealing Diabetic Foot Ulcers. Advances in skin and Wound Care Jour. 2008; 21(12): 568-575.
10. Vinay K, Cotran R y Robbins S. Patología Humana. Quinta Edición Capitulo 1. Lesión y adaptación celulares. Interamericana-Mc Graw-Hill. Pp 3-47.

11. Kim P, Heilala M, Steinberg J y col. Bioengineered Alternative Tissues and hyperbaric Oxygen in Lower extremity Wound Healing. Clin Podiatr Med Surg 2007; 24: 529-546.
12. Reish RG, Eriksson E. Scar Treatments: Preclinical and Clinical Studies. Am Coll Surg. 2008; 206(4): 719-730.
13. Jeong SH, Han K, Kim WK. Treatment of Diabetic Foot Ulcers Using a Blood Bank Platelet Concentrate. Plas Reconstr Surg. 2010; 125(3):944-952.
14. Panuncialman J, Falanga V. The Science of Wound Bed Preparation. Surg Clin N Am. 2009; 89: 611-626.
15. Grotendorst GR, Martin GR, Pencev D y col. Simulation of granulation tissue formation by platelet-derived growth factor in normal and diabetic rats. J Clin Invest 1985; 76(6): 2323-9.
16. Platelet-rich plasma therapy: Harnessing the healing power of these blood cells is intriguing, but research is lacking. Harvard Health Letter. Oct 2009. www.health.harvard.edu.
17. Pietramaggiore G, Kaipainen A, Czeizler J y col. Freeze-dried platelet-rich plasma shows beneficial healing properties in chronic wounds. Wound Rep Reg 2006; 14: 573-580.
18. Mazzucco L, Balbo E, Cattana P. Platelet-rich and platelet gel preparation using Platelex®. Vox Sanguinis. 2008; 94: 202-208.
19. Rutkowski JL, Thomas J, Bering L y col. An Analysis of A Rapid, Simple, and Inexpensive Technique Used to Obtain Platelet-Rich Plasma for Use in Clinical Practice. Jour Oral Implan. 2008; 34(1): 25-33.
20. Zimmermann R, Resje S, Metzler P y col. Preparation of highly concentrated and white cell-poor platelet-rich plasma by plateletpheresis. Vox Sanguinis 2008; 95: 20-25.
21. Leitner G, Gruber R, Neumuller J y col. Platelet content growth factor release in platelet-rich plasma: a comparison of four different systems. Vox Sanguinis 2006; 91: 135-139.

- 22.Kakudo N, Kushida S, Kusumoto K. Platelet-rich Plasma: the importance of platelet separation and concentration. *Plas Recons Surg Letters*. 2009; 123(3): 1135-1136.
- 23.Kurita M, Aiba-Kojima E, Yoshimura K. Reply: Platelet-rich Plasma: the importance of platelet separation and concentration. *Plas Recons Surg Letters*. 2009; 123(3): 1136-1137.
- 24.Glover JL, Weingarten MS, Buchbinder y col. A 4-year outcome based retrospective study of wound healing and limb salvage in patients with chronic wounds. *Adv Wound Care*. 1997;10(1):33-38.
- 25.Margolis DJ, Kantor J, Santana J y col. Effectiveness of platelet release for the treatment of diabetic neuropathic foot ulcers. *Diabetes Care*. 2001; 24(3):483-8.
- 26.Mishra A, Woodsall J, Vieira A. Treatment of tendon and muscle using platelet-rich plasma. *Clin Sports Med*. 2009; 28:113-125.
- 27.Deans R, Moseley A. Mesenchymal stem cells: Biology and potential clinical uses. *Exp. Hematol*. 28: 875; 2000.
- 28.Badiavas EV, Abedi M, Butmarc J, Falanga V, Quesenberry P. Participation of bone marrow derived cells in cutaneous wound healing. *J Cell Physiol*. 2003;196:245–50.
- 29.Singer AJ, Clark RA. Cutaneous wound healing. *N Engl J Med*. 1999; 341:738–46.
- 30.Barry FP, Murphy JM. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004;36:568–84
- 31.Stoff A, Rivera A, Moore S, Banerjee S, Numnum M, Richter D, Siegal G, et al.Promotion of incisional wound repair by human mesenchymal stem cell transplantation. *Exp Dermatol*. 2009 April; 18(4):362-369.
- 32.Prockop DJ, Gregory CA, Spees JL. One strategy for cell and gene therapy: harnessing the power of adult stem cells to repair tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100 1:11917–23

33. Mansilla E, Marin GH, Sturla F, Drago HE, Gil MA, Salas E, Gardiner MC, Piccinelli G, Bossi S, Petrelli L, Iorio G, Ramos CA, Soratti C. Human mesenchymal stem cells are tolerized by mice and improve skin and spinal cord injuries. *Transplant Proc.* 2005;37:292–4.
34. Spees JL, Olson SD, Ylostalo J, Lynch PJ, Smith J, Perry A, Peister A, Wang MY, Prockop DJ. Differentiation, cell fusion, and nuclear fusion during ex vivo repair of epithelium by human adult stem cells from bone marrow stroma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100:2397–402.
35. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B, Pickel J, McKay R, Nadal-Ginard B, Bodine DM, Leri A, Anversa P. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature.* 2001;410:701–5.
36. Ortiz LA, Gambelli F, McBride C, Gaupp D, Baddoo M, Kaminski N, Phinney DG. Mesenchymal stem cell engraftment in lung is enhanced in response to bleomycin exposure and ameliorates its fibrotic effects. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100:8407–11.
37. Teng YD, Lavik EB, Qu X, Park KI, Ourednik J, Zurakowski D, Langer R, Snyder EY. Functional recovery following traumatic spinal cord injury mediated by a unique polymer scaffold seeded with neural stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99:3024–9.
38. Sekiya I, Larson BL, Smith JR, Pochampally R, Cui JG, Prockop DJ. Expansion of human adult stem cells from bone marrow stroma: conditions that maximize the yields of early progenitors and evaluate their quality. *Stem Cells.* 2002;20:530–41.
39. Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science.* 1997;276:71–4.
40. Hebda PA, Dohar JE. Transplanted fetal fibroblasts: survival and distribution over time in normal adult dermis compared with autogenic, allogenic, and xenogenic adult fibroblasts. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 1999;121:245–51.
41. Liechty KW, Nesbit M, Herlyn M, Radu A, Adzick NS, Crombleholme TM. Adenoviral-mediated overexpression of platelet-derived growth factor-B corrects ischemic impaired wound healing. *J Invest Dermatol.* 1999;113:375–83.

42. Singer AJ, Thode HC, Jr, McClain SA. Development of a histomorphologic scale to quantify cutaneous scars after burns. *Acad Emerg Med.* 2000;7:1083–8.
43. Hunt TK. Basic principles of wound healing. *J Trauma.* 1990;30:S122–8.
44. Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature.* 2002;418:41–9.
45. Swanson NA, Tromovitch TA. Suture materials, 1980s: properties, uses, and abuses. *Int J Dermatol.* 1982;21:373–8.
46. Singer DD, Singer AJ, McClain SA, Tortora G. Histologic effects of laser-assisted topical anesthesia in a porcine model. *Acad Emerg Med.* 2005;12:1148–52.
47. Bartholomew A, Sturgeon C, Siatskas M, Ferrer K, McIntosh K, Patil S, Hardy W, Devine S, Ucker D, Deans R, et al. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. *Exp Hematol.* 2002;30:42–48.
48. Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M, Milanese M, Longoni PD, Matteucci P, Grisanti S, Gianni AM, Longoni PD. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood.* 2002;99:3838–3843.
49. Tse WT, Pendleton JD, Beyer WM, Egalka MC, Guinan EC. Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implication in transplantation. *Transplantation.* 2003;75:389–397.
50. Krampera M, Glennie S, Dyson J, Scott D, Laylor R, Simpson E, Dazzi F. Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naïve and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide. *Blood.* 2003;101:3722–3729.
51. Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M, Milanese M, Longoni PD, Matteucci P, Grisanti S, Gianni AM. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood.* 2002;99:3838–43.

52. Liu H, Kemeny DM, Heng BC, Ouyang HW, Melendez AJ, Cao T. The immunogenicity and immunomodulatory function of osteogenic cells differentiated from mesenchymal stem cells. *J Immunol.* 2006;176:2864–71.
53. Daans J, Spaepen G, Chatterjee S, Vermeulen K, D'Haese P, Van Tendeloo VF, Van Marck E, Ysebaert D, Berneman ZN, Jorens PG, Ponsaerts P. Plasmid-based genetic modification of human bone marrow-derived stromal cells: analysis of cell survival and transgene expression after transplantation in rat spinal cord. Ronsyn MW, editor. *BMC Biotechnol.* 2007;7:90.
54. Wang Y, Chen X, Armstrong MA, Li G. Survival of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in a xenotransplantation model. *J Orthop Res.* 2007;25:926–32.
55. Lawrence WT. Physiology of the acute wound. *Clin Plast Surg.* 1998;25:321–40.
56. Yamamoto M, Yanaga H, Nishina H, Watabe S, Mamba K. Fibrin stimulates the proliferation of human keratinocytes through the autocrine mechanism of transforming growth factor-alpha and epidermal growth factor receptor. *Tohoku J Exp Med.* 2005;207:33–40.
57. Nakagawa H, Akita S, Fukui M, Fujii T, Akino K. Human mesenchymal stem cells successfully improve skin-substitute wound healing. *Br J Dermatol.* 2005;153:29–36.
58. Francois S, Mouiseddine M, Mathieu N, Semont A, Monti P, Dudoignon N, Sache A, Boutarfa A, Thierry D, Gourmelon P, Chapel A. Human mesenchymal stem cells favour healing of the cutaneous radiation syndrome in a xenogenic transplant model. *Ann Hematol.* 2007;86:1–8.
59. Arora NS, Ramanayake TA, Ren YF y col. Platelet-Rich Plasma: A literatura Review. *Implan Dent.* 2009; 18(4):303-310.
60. Smith SE., Roukis T. Bone and Wound Healing Augmentation with Platelet-Rich Plasma. *Clin Podiatr Med Surg.* 2009;26: 559-588.
61. Moseley T, Zhu M, Hedrick M. Adipose-Derived Stem and Progenitor Cells as Fillers in Plastic and Reconstructive Surgery. *Plast. Reconstr. Surg.* 118 (Suppl.): 121S; 2006.

- 62.Humble G, Mest D. Soft tissue augmentation using silicone. An historical review. *Facial Plast. Surg.* 20:181; 2004.
- 63.Kanchwala S, Holloway L, Bucky L. Reliable soft tissue augmentation: A clinical comparison of injectable soft tissue fillers for facial-volume augmentation. *Ann. Plast. Surg.* 55: 30; 2005.
- 64.Yoon E, Han S, Kim W. Advantages of the presence of living dermal fibroblasts within restylane for soft tissue augmentation. *Ann. Plast. Surg.* 51: 587; 2003.
- 65.Kaufman M, Miller T, Huang C, Roostaien J, Wasson K, Ashley R et al. Autologous Fat Transfer for Facial Recontouring: Is There Science behind the Art?. *Plast. Reconstr. Surg.* 119: 2287,2007.
- 66.Carpaneda C, Ribeiro M. Percentage of graft viability versus injected volume in adipose autotransplants. *Aesthetic. Plast. Surg.* 18: 17, 1994.
- 67.Coleman S. Facial recontouring with lipostructure. *Clin. Plast. Surg.* 24: 347, 1997.
- 68.Coleman S. Hand rejuvenation with structural fat grafting. *Plast. Reconstr. Surg.* 110: 1731, 2002
- 69.Ellengogen R. Free autogenous pearl fat grafts in the face: A preliminary report of a rediscovered technique. *Ann. Plast. Surg.* 16: 179, 1986.
- 70.Carraway J, Mellow C. Syringe aspiration and fat concentration: A simple technique of autologous fat injection. *Ann. Plast. Surg.* 24: 293; 1990.
- 71.Guerrerosantos J. Long-term outcome of autologous fat transplantation in aesthetic facial recontouring. *Clin. Plast. Surg.* 27: 515; 2000.
- 72.Clabria R. Fat grafting: Fact or fiction? *Aesthetic. Surg.* 25: 55; 2005.
- 73.Rohrich R, Sorokin E, Brown S. In search of improved fat transfer viability: A quantitative analysis of the role of centrifugation and harvest site. *Plast. Reconstr. Surg.* 113: 391, 2004.

74. Nguyen A, Pasyk K, Bouvier T. Comparative study of survival of autologous adipose tissue taken and transplanted by different techniques. *Plast. Reconstr. Surg.* 85: 378; 1990.
75. Pu L, Cui X, Fink M. The viability of fatty tissues within adipose aspirates after conventional liposuction. *Ann. Plast. Surg.* 54; 288: 2005.
76. Moore J, Kolaczynski J, Morales L. Viability of fat obtained by syringe suction lipectomy: Effects of local anesthesia with lidocaine. *Aesthetic. Plast. Surg.* 19: 335; 1995.
77. Yuksel E, Weinfeld A, Cleek R. Increased free fat-graft survival with the long-term, local delivery of insulin, insulin-like growth factor-I and basic fibroblast growth factor by PLGA/PEG microspheres. *Plast. Reconstr. Surg.* 105: 1712; 2000.
78. Eppley B, Woodell J, Higgins J. Platelet Quantification and Growth Factor Analysis from Platelet-Rich Plasma: Implications for Wound Healing. *Plast. Reconstr. Surg.* 114: 1502; 2004.
79. Deans R, Moseley A. Mesenchymal stem cells: Biology and potential clinical uses. *Exp. Hematol.* 28: 875; 2000.
80. Ribo P, Gagliardi C. Obtención y criopreservación de células madre del tejido graso mediante liposucción. Collecting and criopreservation of stem cells obtained by liposuction from fat tissue. *Cir.plást.Iberolatinoam.* vol 37. N°4. Oct-dic 2011/pág.319-324.
81. Lee Q. La criopreservación de tejido adiposo. *Organogenesis* Jul-Sept. 2009. 5(3). Pág. 138-142.
82. Phanette G, Oni G, Brown L, Rohrich R. Human adipose stem cells: current clinical applications. *Plast. Reconstr. Surg.* 129:1277, 2012.
83. Almeida K, Campa A, Alonso M, Lima F, Daud E, Stocchero I. Fracción vascular estromal de tejido adiposo: como obtener células madre y su rendimiento de acuerdo a la topografía de las áreas donantes: estudio preliminar. Stromal vascular fraction from fat tissue: obtaining stem cells and their yield according to the topography of the donor areas: previous note. *Cir.plást.Iberolatinoam.* vol 34. N°1. Ene-mar 2008/pág 71-79.

ANEXOS

Anexo 1

CONSENTIMIENTO INFORMADO

INTRODUCCIÓN

La liposucción es una técnica quirúrgica para eliminar depósitos de grasa inestéticos de determinadas áreas del cuerpo, incluyendo cara y cuello, brazos, tronco, abdomen, nalgas, caderas y muslos, rodillas, pantorrillas y tobillos. La liposucción no es un sustituto de la reducción de peso, sino un método para eliminar depósitos localizados de tejido graso que no responden a la dieta o el ejercicio. La liposucción puede ser realizada como un procedimiento primario para mejorar el contorno corporal, o en combinación con otras técnicas quirúrgicas, como Lifting facial, abdominoplastia, o Lifting de muslos, para tensar la piel relajada y estructuras de soporte. El mejor candidato para una liposucción es el individuo de peso relativamente normal que posee un exceso de grasa en áreas determinadas del cuerpo. Una piel firme y elástica lleva a un mejor contorno final después de la liposucción. La piel colgante no se readapta por sí misma al nuevo contorno, y puede requerir técnicas quirúrgicas adicionales para eliminar y tensar el exceso de piel. Las irregularidades del contorno corporal debidas a estructuras diferentes de la grasa no pueden ser mejoradas con liposucción. La liposucción por sí misma no mejora las áreas de piel irregular conocida como "celulitis". Hay una variedad de técnicas diferentes usadas por los cirujanos plásticos para la lipectomía asistida por succión y los cuidados tras la cirugía. Su cirujano puede recomendarle el extraer una unidad de su propia sangre que podría ser utilizada si fuera necesaria una transfusión sanguínea después de la cirugía.

TRATAMIENTO ALTERNATIVO

Las formas alternativas de manejo pueden consistir en no tratar las áreas de depósito graso. Los regímenes de dieta y ejercicio pueden ser beneficiosos en la reducción global del exceso de grasa corporal. La eliminación directa del exceso

de piel y tejido graso puede ser necesaria además de la liposucción en algunos pacientes.

RIESGOS DE LA LIPOSUCCIÓN

Cualquier procedimiento quirúrgico entraña un cierto grado de riesgo y es importante que usted comprenda los riesgos asociados a la liposucción. La decisión individual de someterse a una intervención quirúrgica se basa en la comparación del riesgo con el beneficio potencial. Aunque la mayoría de los pacientes no experimentan las siguientes complicaciones, usted debería discutir cada una de ellas con su cirujano plástico para asegurarse de que comprende los riesgos, complicaciones potenciales y consecuencias de la liposucción.

Selección del paciente. Los individuos con tono pobre de la piel, problemas médicos, obesidad, o expectativas no realistas, pueden no ser candidatos para una liposucción.

Sangrado. Es posible, aunque raro, que se presente un episodio de hemorragia durante o después de la cirugía. Si se desarrolla una hemorragia postoperatoria, puede requerir tratamiento de urgencia para extraer la sangre acumulada, o transfusión de sangre. No debe tomar aspirina o antiinflamatorios desde 10 días antes de la cirugía, puesto que pueden aumentar el riesgo de problemas de sangrado.

Infección. La infección después de este tipo de cirugía es muy rara. Si ocurre una infección, puede ser necesario tratamiento adicional, incluyendo antibióticos o cirugía.

Cambios en la sensibilidad cutánea. Pueden ocurrir cambios temporales en la sensibilidad cutánea después de una liposucción, que habitualmente se resuelven. La disminución o pérdida completa de la sensibilidad cutánea ocurre infrecuentemente y pueden no resolverse totalmente.

Cicatrización. Aunque se espera una buena curación después del procedimiento quirúrgico, pueden darse cicatrices anormales tanto en la piel como en los tejidos profundos. En casos raros pueden darse cicatrices anormales. Las cicatrices pueden ser inestéticas o de color diferente al de la piel circundante. Pueden necesitarse tratamientos adicionales incluyendo cirugía para tratar la cicatrización anormal.

Irregularidades del contorno de la piel. Pueden ocurrir irregularidades del contorno y depresiones de la piel después de una liposucción. Puede darse un plegamiento visible y palpable de la piel. Pueden necesitarse tratamientos adicionales incluyendo cirugía para tratar irregularidades del contorno de la piel tras una liposucción.

Asimetría. Puede no conseguirse un aspecto simétrico del cuerpo tras la liposucción. Factores como el tono de la piel, prominencias óseas, y tono muscular, pueden contribuir a una asimetría normal en los rasgos corporales.

Shock quirúrgico. En raras circunstancias, este procedimiento puede causar un trauma severo, particularmente cuando se succionan áreas múltiples o extensas en un mismo tiempo. Aunque son infrecuentes las complicaciones serias, infecciones o una excesiva pérdida de fluidos pueden llevar a un problema serio o incluso la muerte. Si ocurre un shock quirúrgico después de una liposucción, puede necesitarse hospitalización y tratamiento adicional.

Complicaciones pulmonares. El síndrome de embolismo graso ocurre cuando se atrapan gotas de grasa en los pulmones. Esta es una complicación muy rara y posiblemente fatal de la liposucción. Si ocurre una embolia grasa o cualquier otra complicación pulmonar tras la liposucción puede necesitarse tratamiento adicional incluyendo hospitalización.

Pérdida de piel. La pérdida cutánea es rara tras una liposucción. Pueden necesitarse tratamientos adicionales, incluyendo cirugía.

Seroma. Los acúmulos de fluido ocurren infrecuentemente en áreas donde se ha realizado liposucción. Pueden ser necesarios tratamientos adicionales o cirugía para drenar los acúmulos de fluido.

Efectos a largo plazo. Pueden ocurrir alteraciones posteriores en el contorno corporal como resultado del envejecimiento, pérdida o ganancia de peso, embarazo u otras circunstancias no relacionadas con la liposucción.

Reacciones alérgicas. En casos raros se han descrito alergias locales al esparadrapo, material de sutura o preparados tópicos. Pueden ocurrir reacciones sistémicas, que son más graves, frente a medicaciones usadas durante la cirugía o prescritas después. Las reacciones alérgicas pueden requerir tratamiento adicional.

Otros. Usted puede estar insatisfecho con los resultados de la cirugía. Infrecuentemente se necesita realizar cirugía adicional para mejorar los resultados.

Anestesia. Tanto la anestesia local como la general implican un riesgo. Existe la posibilidad de complicaciones, lesiones e incluso muerte, por cualquier forma de anestesia o sedación quirúrgica.

NECESIDAD DE CIRUGÍA ADICIONAL

Existen muchas condiciones variables además de los riesgos y complicaciones quirúrgicas potenciales que pueden influir en los resultados a largo plazo de la liposucción. Aunque los riesgos y complicaciones son raros, los riesgos citados están particularmente asociados con la liposucción. Pueden ocurrir otros riesgos y complicaciones, pero son todavía más infrecuentes. Si ocurren complicaciones, puede ser necesaria la cirugía adicional u otros tratamientos. La práctica de la Medicina y la Cirugía no es una ciencia exacta, y aunque se esperan buenos resultados, no hay garantía explícita o implícita sobre los resultados que pueden

obtenerse.

RESPONSABILIDADES ECONÓMICAS

El coste de la cirugía resulta de diversos cargos por servicios prestados. El total incluye los honorarios del cirujano, el coste del material quirúrgico, anestesia, pruebas de laboratorio, y posibles cargos del hospital, dependiendo de dónde se realice la cirugía. Si el coste de la cirugía está cubierto por un seguro, usted puede ser responsable de pagos adicionales, deducciones y cargos no cubiertos. Puede haber costes adicionales si se dan complicaciones derivadas de la cirugía. Los cargos por cirugía secundaria o cirugía hospitalaria de día relacionados con revisión quirúrgica podrían también correr a su cargo.

RENUNCIA

Los documentos de consentimiento informado se emplean para comunicar información acerca del tratamiento quirúrgico propuesto para una enfermedad o condición determinada, así como para mostrar los riesgos y formas alternativas de tratamiento. El proceso de consentimiento informado pretende definir los principios para dar a conocer los riesgos, que generalmente satisfacerá las necesidades de la mayoría de los pacientes en la mayoría de las circunstancias. Sin embargo, no debe considerarse que los documentos de consentimiento informado incluyan todos los aspectos sobre otros métodos de tratamiento o riesgos posibles. Su Cirujano Plástico puede proporcionarle información adicional o diferente, basada en todos los hechos de su caso particular y en el estado del conocimiento médico. Los documentos de consentimiento informado no pretenden definir o servir como el modelo del cuidado médico. Éste será determinado basándose en todos los hechos involucrados en un caso individual, y está sujeto a cambios, puesto que el conocimiento científico y la tecnología avanzan, y los modelos de práctica evolucionan.

Otro de los procedimientos a realizar en el presente estudio es La aspiración

medular que consiste en puncionar y extraer sangre del interior del hueso seleccionado.

La aspiración medular suele realizarse en el esternón, (hueso situado en el centro del pecho) o en la cresta ilíaca posterior (parte postero-superior de la cadera). Riesgos frecuentes: En el momento de la aspiración o de la biopsia puede notar algo de dolor en el lugar de punción. En la zona donde se le ha realizado la prueba, puede quedar un hematoma que desaparecerá a los pocos días. Riesgos poco frecuentes, cuando sean de especial gravedad y estén asociados al procedimiento por criterios científicos: Eventualmente se han descrito hemorragias internas (por punción de alguna arteria retroesternal) o dolor radicular en el territorio del nervio ciático.

EL Plasma Rico en Plaquetas es un material autólogo, quiere decir que se obtiene del propio paciente. Después de extraer cuidadosamente unos 60 ml de sangre venosa del antebrazo en tubos con anticoagulante, se procede a una centrifugación protocolizada. Al centrifugar, se obtiene la separación de las diferentes fracciones de la sangre.

ES IMPORTANTE QUE LEA CUIDADOSAMENTE LA INFORMACIÓN ANTERIOR Y HAYAN SIDO RESPONDIDAS TODAS SUS PREGUNTAS ANTES DE QUE FIRME EL CONSENTIMIENTO DE LA PÁGINA SIGUIENTE.

Yo _____

Cl _____

En pleno uso de mis facultades, libre y voluntariamente manifiesto que he sido informado y en consecuencia autorizo a que se me incluya en el trabajo de investigación “Diferenciación de las Células Madre Mesenquimales, Hematopoyéticas y Plasma rico en plaquetas en tejido adiposo adulto in vitro” en el Hospital Universitario de Caracas por el Servicio de Cirugía Plástica, Reconstructiva y Maxilofacial, teniendo en cuenta que:

1. He comprendido la naturaleza y propósito del estudio.
2. He tenido la oportunidad de aclarar mis dudas.
3. Estoy satisfecho(a) con la información proporcionada.
4. Reconozco que todos los datos proporcionados referente al historial médico son ciertos y que no he omitido ninguno que pueda influir en el estudio.

Por tanto, declaro estar debidamente informado y doy mi expreso consentimiento para ser incluido en el trabajo propuesto.

Anexo 2

VARIABLES

Operacionalización de variables:

VARIABLES	INDICADORES	SUBINDICADORES
DEPENDIENTE		
Tejido adiposo: cualitativa nominal dicotómica	Unilocular, multilocular	Si/No
INDEPENDIENTES		
Células madre: cualitativa ordinal dicotómica.	Mesenquimales, hematopoyéticas	
Plasma rico en plaquetas: cualitativa nominal dicotómica		Si/No
Tejido endotelial: cualitativa nominal dicotómica.		Si/No
Tiempo de diferenciación: cualitativa ordinal politómica.	1-3 días, 4-6 días, 7-9 días.	