



Universidad Central de Venezuela
Facultad de Medicina
Comisión de Estudios de Postgrado
Curso de Especialización en Cirugía Plástica y Reconstructiva
Hospital Militar "Dr. Carlos Arvelo"

**TEJIDO ADIPOSEO ENRIQUECIDO CON CÉLULAS MADRE ADULTAS
AUTÓLOGAS EN LIPOINJERTO**

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

Aquiles Manuel Siverio Blanca.
Gerardo Alexander Toro Parrilli.

Tutor: Nikolaos Antoniadis Petrakis.

Caracas, diciembre de 2012



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE MEDICINA
COMISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO
VEREDICTO



Quienes suscriben, miembros del jurado designado por el Consejo de la Facultad de Medicina de la Universidad Central de Venezuela, para examinar el **Trabajo Especial de Grado** presentado por: **Aquiles Manuel Siverio Blanca C.I.: 13.920.405**, bajo el título **“TEJIDO ADIPOSEO ENRIQUECIDO CON CÉLULAS MADRE ADULTAS AUTÓLOGAS EN LIPOINJERTO”**, a fin de cumplir con el requisito legal para optar al grado académico de **Especialista en Cirugía Plástica y Reconstructiva – HMCA**, dejan constancia de lo siguiente:

1.- Leído como fue dicho trabajo por cada uno de los miembros del jurado, se fijó el día 03 de Diciembre de 2012 a las 09:42 a.m., para que el autor lo defendiera en forma pública, lo que éste hizo en el Hospital Militar “Dr. Carlos Arvelo”, mediante un resumen oral de su contenido, luego de lo cual respondió satisfactoriamente a las preguntas que le fueron formuladas por el jurado, todo ello conforme con lo dispuesto en el Reglamento de Estudios de Postgrado.

2.- Finalizada la defensa del trabajo, el jurado decidió aprobarlo, por considerar, sin hacerse solidario con las ideas expuestas por el autor, que se ajusta con lo dispuesto y exigido en el Reglamento de Estudios de Postgrado.

Para dar este veredicto, el jurado estimó que el trabajo examinado es de alta calidad científica.

3.- El jurado por unanimidad decidió otorgar la calificación de EXCELENTE al presente trabajo por considerarlo de excepcional calidad. Recomendándose la publicación y MENCIÓN HONORÍFICA.

En fe de lo cual se levanta la presente ACTA, a los 03 días del mes de diciembre del año 2012, conforme a lo dispuesto en el Reglamento de Estudios de Postgrado, actuó como Coordinador del jurado Nikolaos Antoniadis Petrakis.

Irama Pérez / C.I. 11.163.422
Hospital Universitario de Caracas

Thais González / C.I. 10.328.016
Hospital Militar Dr. Carlos Arvelo



Nikolaos Antoniadis / C.I. 10.871.156
Hospital Militar Dr. Carlos Arvelo
Tutor(a)



AS 03 de diciembre de 2012



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE MEDICINA
COMISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO
VEREDICTO



Quienes suscriben, miembros del jurado designado por el Consejo de la Facultad de Medicina de la Universidad Central de Venezuela, para examinar el **Trabajo Especial de Grado** presentado por: **Gerardo Alexander Toro Parilli C.I.: 14.382.936**, bajo el título **"TEJIDO ADIPOSO ENRIQUECIDO CON CÉLULAS MADRE ADULTAS AUTÓLOGAS EN LIPOINJERTO"**, a fin de cumplir con el requisito legal para optar al grado académico de **Especialista en Cirugía Plástica y Reconstructiva – HMCA**, dejan constancia de lo siguiente:

1.- Leído como fue dicho trabajo por cada uno de los miembros del jurado, se fijó el día 03 de Diciembre de 2012 a las 09:42 a.m., para que el autor lo defendiera en forma pública, lo que éste hizo en el Hospital Militar "Dr. Carlos Arvelo", mediante un resumen oral de su contenido, luego de lo cual respondió satisfactoriamente a las preguntas que le fueron formuladas por el jurado, todo ello conforme con lo dispuesto en el Reglamento de Estudios de Postgrado.

2.- Finalizada la defensa del trabajo, el jurado decidió aprobarlo, por considerar, sin hacerse solidario con las ideas expuestas por el autor, que se ajusta con lo dispuesto y exigido en el Reglamento de Estudios de Postgrado.

Para dar este veredicto, el jurado estimó que el trabajo examinado es de alta calidad científica.

3.- El jurado por unanimidad decidió otorgar la calificación de EXCELENTE al presente trabajo por considerarlo de excepcional calidad. Recomendándose la publicación y MENCIÓN HONORÍFICA.

En fe de lo cual se levanta la presente ACTA, a los 03 días del mes de diciembre del año 2012, conforme a lo dispuesto en el Reglamento de Estudios de Postgrado, actuó como Coordinador del jurado Nikolaos Antoniadis Petrakis.

Iraima Pérez / C.I. 11.163.422
Hospital Universitario de Caracas

Thais González / C.I. 10.328.016
Hospital Militar Dr. Carlos Arvelo



Nikolaos Antoniadis / C.I.10.871.156
Hospital Militar Dr. Carlos Arvelo
Tutor(a)



AS 03 de diciembre de 2012

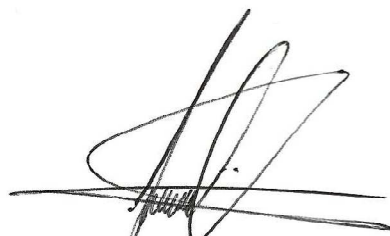
UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
VICERRECTORADO ACADÉMICO
SISTEMA DE INFORMACIÓN CIENTÍFICA, HUMANÍSTICA Y TECNOLÓGICA
(SICHT)
FECHA: 03 de Diciembre de 2012

AUTORIZACIÓN PARA LA DIFUSIÓN ELECTRONICA DE LOS TRABAJOS DE LICENCIATURA, TRABAJO ESPECIAL DE GRADO, TRABAJO DE GRADO Y TESIS DOCTORAL DE LA UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA.

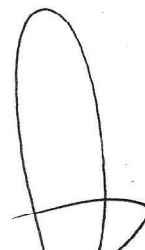
*Nosotros, Aquiles Manuel Siverio Blanca y Gerardo Alexander Toro Parilli, autores del trabajo especial de grado, **TEJIDO ADIPOSEO ENRIQUECIDO CON CÉLULAS MADRE ADULTAS AUTÓLGAS EN LIPOINJERTO** Presentado para optar: al título de **Especialistas en Cirugía Plástica y Reconstructiva.***

Autorizamos a la Universidad Central de Venezuela, a difundir la versión electrónica de este trabajo, a través de los servicios de información que ofrece la Institución, sólo con fines de académicos y de investigación, de acuerdo a lo previsto en la Ley sobre Derecho de Autor, Artículo 18, 23 y 42 (Gaceta Oficial N° 4.638 Extraordinaria, 01-10-1993).

Si autorizamos.



Aquiles M. Siverio B.
C.I. N° 13.920.405
e-mail: aquilessiverio@yahoo.com



Gerardo A. Toro P.
C.I N° 14.382.936
e-mail: gerardtoro2qmail.com

En Caracas, a los 03 días del mes de Diciembre de 2012.

DR. NIKOLAOS ANTONIADIS P.

TUTOR DEL PROYECTO

ADJUNTO DOCENTE DEL POST GRADO DE CIRUGIA PLASTICA Y
RECONSTRUCTIVA
HOSPITAL MILITAR "DR. CARLOS ARVELO"

DR. JESÚS PEREIRA

DIRECTOR DEL CURSO DE POSTGRADO DE CIRUGÍA PLÁSTICA Y
RECONSTRUCTIVA
HOSPITAL MILITAR "DR. CARLOS ARVELO"

DRA. MARÍA R. FERMIN

COORDINADORA DEL CURSO DE POSTGRADO DE CIRUGÍA PLÁSTICA Y
RECONSTRUCTIVA
HOSPITAL MILITAR "DR. CARLOS ARVELO"

DRA. KAREM NORIS-SUAREZ.

ASESORA DEL PROYECTO

INVESTIGADOR ASOCIADO

LABORATORIO DE INGENIERIA DE TEJIDOS

DPTO. BIOLOGIA CELULAR. UNIVERSIDAD SIMÓN BOLIVAR

LIC. DOUGLAS ANGULO

ASESOR ESTADÍSTICO

ÍNDICE DE CONTENIDO

Resumen.....	5
Introducción.....	7
Métodos.....	17
Resultados.....	21
Discusión.....	22
Conclusiones.....	28
Recomendación.....	29
Referencias.....	30
Anexos.....	33

TEJIDO ADIPOSO ENRIQUECIDO CON CÉLULAS MADRE ADULTAS AUTÓLOGAS EN LIPOINJERTO

Aquiles Manuel Siverio Blanca, C.I. 13.920.405. Sexo: Masculino, E-mail: aquilessiverio@yahoo.com. Tífs.: 0426-5155638/ 0414-2336773. Dirección: Hospital Militar “Dr. Carlos Arvelo”. Especialización en Cirugía Plástica y Reconstructiva.

Gerardo Alexander Toro Parilli, C.I. 14.382.936 .Sexo: Masculino, E-mail: gerardtoro2@gmail.com. Telf.: 0414-4179804. Dirección: Hospital Militar “Dr. Carlos Arvelo”. Especialización en Cirugía Plástica y Reconstructiva.

Tutor: **Nikolaos Antoniadis Petrakis**. C.I. 10.871.156. Sexo: Masculino, E-mail: nikosurgery@hotmail.com Telf.: 0414-3339077. Dirección: Hospital Militar “Dr. Carlos Arvelo”. Especialista en Cirugía Plástica y Reconstructiva.

RESUMEN

Objetivo: Describir la técnica de lipoinjerto enriquecido con células madre adultas autólogas expandidas *in vitro*, en pacientes con surcos nasogenianos prominentes. Método: 16 pacientes del sexo femenino, se dividieron al azar en dos grupos de 8 pacientes cada uno, el grupo “A” se trató con lipoinjerto enriquecido con células madre expandidas *in vitro* y el grupo “B” se trató con lipoinjerto. Se compararon fotografías de antes y después en un período de 6 meses. Resultados: de acuerdo al análisis de varianza de una vía, tanto del grupo de pacientes tratadas con células madre como del grupo control, no hubo diferencias estadísticas significativas en los resultados estéticos. Con respecto a la satisfacción de las pacientes se observó diferencias estadísticas significativas en la escala estática ($p = 0,004$) entre los grupos analizados. Cuando se correlacionó el número de células madre expandidas *in vitro* implantadas con los resultados estéticos, no hubo correlación lineal significativa. Conclusiones: El aislamiento de células madres adultas del lipoaspirado es viable. La replicación *in vitro* de estas células madre es factible en nuestro medio. El relleno de surcos nasogenianos con lipoinjerto es un método poco costoso, lo cual contrasta con el enriquecimiento con células madre autólogas. El grado de satisfacción de las pacientes tratadas con lipoinjertos enriquecidos con células madre autólogas fue mayor. La falta de correlación positiva entre el número de células estromales expandidas *in vitro* implantadas con los resultados estéticos fue debido al tamaño de la muestra.

Palabras Claves: **Células Madre, Células Estromales, Lipoinjerto, Replicación *in vitro*.**

ADIPOSE TISSUE ENRICHED WITH AUTOLOGOUS ADULT STEM CELLS FOR LIPOGRAFTING

ABSTRACT

Objective: Describe fat transfer enriched with autologous adult stem cell technique expanded in vitro in patients with prominent nasolabial grooves. Method: 16 female patients, were divided randomly into two groups of 8 patients each, group "A" was treated with fat transfer enriched with autologous adult stem cell technique expanded in vitro and the "B" group was treated with fat transfer. We compared photos of before and after in a period of 6 months. Results: According to the analysis of variance of one way, both groups patients treated with stem cells and the control group, there was no significant statistical differences in the aesthetic results. Respect to the satisfaction of the patients was observed significant statistical differences in the static scale ($p = 0.004$) between the groups analyzed. When we correlated the number of expanded in vitro stem cells implanted with the aesthetic results, there was no significant linear correlation. Conclusions: Adult stem cells isolation from lipoaspirate is feasible. Replication in vitro of these stem cells is feasible in our midst. The nasolabial grooves filling with autologous fat is an inexpensive method, which contrasts with the autologous fat transfer enrichment with autologous stem cells. The patients' satisfaction degree treated with fat transfer enriched with autologous adult stem cell was greater. The lack of positive correlation between the number of expanded stromal cells in vitro implanted with the aesthetic results was due to the size of the sample.

Key words: **Stem cells, stromal cells, lipotransfer, in vitro replication.**

INTRODUCCIÓN

En el presente estudio descriptivo, prospectivo, cuasi – experimental se compararán los resultados entre dos grupos de pacientes con surcos nasogenianos prominentes tratados con lipoinjerto; uno con lipoaspirado enriquecido con células madre autólogas expandidas *in vitro* y otro solo con lipoaspirado, con la finalidad de determinar si la permanencia del lipoinjerto es mayor en el primer grupo.

Planteamiento y delimitación del problema

En la práctica clínica de nuestra especialidad es muy frecuente que los pacientes consulten por defectos de volumen o falta de relleno, de etiología diversa, en diferentes regiones anatómicas. Los materiales aloplásticos con los que se cuentan actualmente para el tratamiento de estos defectos son costosos, en algunas oportunidades pueden generar reacciones alérgicas y no son permanentes ⁽¹⁾. El tejido adiposo también se ha utilizado para tal fin, afortunadamente es abundante, el procedimiento es poco costoso, el cirujano plástico está altamente familiarizado con la extracción del mismo, los resultados inmediatos son óptimos en muchos casos; sin embargo a largo plazo los resultados son erráticos, existe reabsorción total o parcial del injerto o reabsorción irregular en el área lipoinjertada ⁽²⁾. Se han descrito varias técnicas que tienen como finalidad mejorar la supervivencia del tejido graso injertado uno de ellos es enriquecer el tejido graso a injertar con células madre, lo que favorecería la neoangiogénesis y por ende la permanencia del lipoinjerto en el área reconstruida ⁽³⁾. No encontramos hasta ahora ningún artículo en el que se utilice la replicación *ex vivo* de las células estromales para luego enriquecer los lipoinjertos en humanos lo que nos motivó a la realización del este protocolo para mejorar la permanencia del tejido graso injertado en zonas reconstruidas.

Uno de los problemas clínicos frecuentes en nuestra consulta que ameritan tratamiento con lipoinyección grasa, son los surcos nasogenianos prominentes, los cuales son cambios característicos del envejecimiento facial; limitaremos nuestro estudio a su tratamiento con lipoinjerto.

El presente trabajo se realizó en el departamento de cirugía plástica, estética, reconstructiva y maxilofacial del hospital militar “Dr. Carlos Arvelo” , se incluyeron pacientes con surcos nasogenianos prominentes, los cuales se trataron con lipoinjerto, en el período junio 2011 a junio 2012.

Justificación e importancia

La demanda de sustitutos para tejidos blandos en cirugía plástica y reconstructiva se está incrementando continuamente. El trasplante autólogo de grasa es un tratamiento prometedor para el aumento de tejidos blandos porque no está asociado a cicatrices, incisiones o complicaciones relacionadas con cuerpos extraños⁽¹⁾.

Desafortunadamente, muchas técnicas de autoinjerto de grasa fallan en mantener un volumen satisfactorio por largo plazo. Esto es debido en parte a la fragilidad de los adipocitos y la falta de vascularización adecuada después del injerto^(2,3). Traumatismos, resecciones tumorales, anomalías congénitas o adquiridas son las causas principales que justifican la necesidad de tejido adiposo sustitutivo en cirugía plástica y las estrategias que involucran el empleo de la ingeniería de tejidos resultan prometedoras como una alternativa terapéutica para dirigir la poca predictibilidad de los autotransplantes de grasa⁽¹⁾.

Antecedentes

El uso de la grasa como autotransplante en humanos fue descrito por primera vez por Van der Meulen en 1889. El proceso consistía en injertar epiplón libre y grasa autóloga entre el hígado y el diafragma. El primer uso de autoinjertos de grasa libre en humanos lo realizó Neuber en 1893, en el cual se usaron múltiples injertos pequeños para rellenar una depresión de tejidos blandos. Neuber, solo utilizó suficiente grasa para rellenar el defecto y reportó excelentes resultados estéticos; sin embargo tuvo poco éxito cuando utilizó injertos grandes, afirmando que “injertos más grandes que una almendra pueden no tener buenos resultados”. Si bien, se han reportado muchos esfuerzos novedosos para refinar la lipoinyección autóloga, persisten problemas como impredecibilidad y una baja tasa de supervivencia del

injerto, probablemente debido a necrosis parcial⁽⁴⁾. La reabsorción oscila entre 20 y 90%, con la necesidad de sobrecorrección e injertos adicionales^(5,6).

Marco teórico

La restauración estructural y funcional exitosa utilizando injertos grasos libres permanece esquiva; el advenimiento y refinamiento de las técnicas de liposucción y lipoinyección, disponibilidad de abundantes áreas donantes y la relativa facilidad para cosechar tejido adiposo ha hecho de la grasa autóloga un material atractivo para el uso como relleno de tejidos blandos⁽⁷⁾.

No se ha documentado bien, como sobreviven los injertos después de la lipoinyección. El tejido adiposo injertado no vascularizado se mantiene bajo isquemia o hipoxia y es temporalmente nutrido por difusión del tejido receptor circundante por unos pocos días hasta que se nutre de los capilares que se formaran progresivamente. En respuesta a la lesión, la respuesta tisular básica libera factor de crecimiento fibroblástico (FGF, por sus siglas en inglés) del tejido huésped lesionado, especialmente a partir de la matriz extracelular y de células lesionadas⁽⁸⁾, otros factores de crecimiento como: factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF por sus siglas en inglés), factor de crecimiento endotelial (EGF por sus siglas en inglés) y factor de crecimiento tumoral α (TGF - α por sus siglas en inglés), que se liberan a partir de las plaquetas activadas en respuesta a la hemorragia local⁽⁹⁾.

El área es infiltrada por células inflamatorias como macrófagos y linfocitos y se secretan citoquinas proinflamatorias como interleuquinas. Durante el proceso de reparación, se sabe que los adipocitos son muy sensibles a la hipoxia, estos mueren en 24 horas si la presión de oxígeno es más baja que el umbral. Sin embargo, se sabe, que las células madre son más resistentes a la isquemia como es el caso de las células madre mesenquimáticas derivadas de la médula ósea, las cuales pueden ser funcionales por 72 horas bajo isquemia⁽¹⁰⁾.

En modelos animales para lesión por isquemia – reperfusión del tejido adiposo, las células madre derivadas del tejido adiposo se observaron involucradas en el proceso

de reparación después del injerto graso y jugaron un papel clave en la adipogénesis y angiogénesis. Un estudio preliminar sugiere que aún si sobreviven adipocitos, estos mueren en pocos meses después del trasplante y son reemplazados por una nueva generación de células, posiblemente se deba al estrés de la isquemia temporal. Por lo tanto, el número de células madre derivadas del tejido graso son probablemente importantes en la remodelación y reparación del tejido⁽¹¹⁾.

Se han propuesto varias técnicas de cosecha y preparación del tejido graso dirigido a injertos. El objetivo de estas técnicas es obtener un gran número de adipocitos supervivientes y consecuentemente unos resultados clínicos más seguros. La técnica de cosecha utilizada para aislamiento de tejido graso, puede ser crítica para la viabilidad subsecuente del tejido graso. Las técnicas comunes incluyen aspiración con jeringa y aspiración con sistema de vacío⁽⁷⁾.

Por consiguiente, pareciera razonable minimizar el trauma al tejido graso durante el tiempo de cosecha y transferencia. Un injerto graso puede sobrevivir mejor si menos células están sometidas a disrupción mecánica o isquémica. Se ha hipotizado que la aspiración con sistema de vacío puede ser más perjudicial para las células grasas que la aspiración con jeringa^(12, 13).

También, se han sugerido varias técnicas de preparación para mejorar la viabilidad a largo plazo de los injertos grasos. Algunos autores defienden el lavado con solución fisiológica⁽¹⁴⁾, mientras que otros recomiendan la centrifugación con la finalidad de separar las células de los detritos y de esta manera disminuir la inducción de la respuesta inflamatoria. Sin embargo, no hay evidencia consistente de que ninguna de estas maniobras sea superior a otra y no hay acuerdo universal en un método ideal para prevenir la reabsorción irregular del injerto⁽¹⁵⁾.

Estudios clínicos y preclínicos muestran que algunos de los restos del injerto trasplantado, mantiene aumentado el volumen de los tejidos blandos. Se presume que la porción del injerto adyacente a la fuente de sangre nativa del área receptora

nutren el injerto y la sustituyen hasta que la vascularización ocurre⁽¹⁶⁾. Presumiblemente, muchas áreas centrales del injerto, que no reciben nutrición mueren. Estos conceptos llevaron a disminuir el tamaño de los injertos de grasa con la esperanza que un pequeño injerto tenga más tejido receptor viable adyacente, resultando en una mejor disponibilidad y difusión de la nutrición celular hasta que la neovascularización ocurra⁽¹⁷⁾.

La medicina regenerativa se refiere a la utilización de células, matriz y/o componentes químicos del cuerpo como materia prima, para restaurar naturalmente la apariencia y función. Esta estrategia se aplica tanto para enfermedades que amenazan la vida como el infarto miocárdico como para indicaciones cosméticas y reconstructivas. En muchos aspectos, las células son el más crítico y escurridizo miembro de la “triada regenerativa”. Las células, a diferencia de muchas macromoléculas de matriz, proteínas, y pequeñas moléculas, no pueden ser manufacturados *per sé*. Estas deben de ser cosechadas, purificadas y en muchos casos multiplicadas para el uso clínico. Por otra parte, estos procesos deben ser llevados a cabo de manera que el potencial terapéutico de las células no se altere parcial o totalmente⁽¹⁸⁾.

Las células madre han recibido atención significativa como una fuente ideal de células con capacidad de regeneración, por su pluripotencialidad y capacidad de replicarse. Además las células han sido utilizadas en forma limitada por décadas con gran éxito clínico. Por ejemplo, las células madre derivadas de la médula ósea, sangre periférica e incluso sangre del cordón umbilical se ha utilizado para tratar varias enfermedades⁽¹⁹⁾.

Aunque las terapias con células madre pueden ser utilizadas alogénicamente, la respuesta inmune relacionada con el trasplante, limita la aplicabilidad universal de los tratamientos celulares alogénicos. Los problemas innatos asociados con los trasplantes alogénicos de células madre, como respuestas inmunes del huésped y el rechazo del injerto se pueden evitar con el uso de células madre autólogas. Además,

células madre autólogas como aquellas derivadas de la médula ósea o el tejido adiposo, pueden ser utilizadas clínicamente para terapia celular regenerativa solo si estas pueden ser obtenidas en cantidades suficientes. Las células madre derivadas del tejido adiposo pueden ser fácilmente procesadas de la grasa lipoaspirada y pueden proveer al médico de una significativa cantidad de células madre pluripotenciales para varias terapias de medicina regenerativa⁽²⁰⁾.

Una restricción crítica a este paradigma es la neovascularización del tejido a injertar, ya que el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos a partir del tejido circundante puede tomar 5 días para infiltrar y proveer una adecuada nutrición, lo cual puede resultar en la muerte celular en el injerto y necrosis tisular^(21, 22).

La técnica de lipoinjerto se refiere a la inyección de grasa autóloga lipoaspirada. En esta técnica se preserva la fragilidad natural del tejido adiposo al momento de cosecharlo y la transferencia cuidadosa de estas pequeñas partículas grasas a localizaciones próximas a estructuras vascularizadas y asociadas a nutrición. La implementación de esta técnica llevó a que mejoraran los resultados de los injertos grasos para muchos cirujanos. La combinación de terapias de células madre con técnicas de lipoinjerto, puede aumentar potencialmente la supervivencia del tejido, porque con las células madre se ha observado que aumenta la angiogénesis⁽²³⁾.

La edad, aparentemente, juega un papel importante en el potencial de las células madre. El número de células madre disponibles para diferenciarse y su plasticidad para diferenciarse en cualquier tejido aparentemente disminuye con la edad⁽²⁴⁾.

Desafortunadamente, los dilemas éticos complican el uso de células madre embrionarias, hay también limitaciones biológicas claves para su uso. El mayor obstáculo es la estabilidad celular, oncogenicidad y formación espontánea de teratoma, así como los trasplantes alogénicos, representan profundos impedimentos para el uso clínico, particularmente para indicaciones que no amenazan la vida⁽²⁵⁾.

Para el futuro previsible, las células madre adultas representan la más promisoría fuente de células para la cirugía plástica. La médula ósea, por ejemplo, ha mostrado contener una población de células madre que tienen potencial regenerativo, las cuales están disponibles para apoyar la reparación y regeneración del tejido óseo, cartilaginoso, graso, cardíaco y eventualmente neuronal. Sin embargo, el uso de células madre derivadas de la médula ósea, está limitada por la cantidad de células que pueden ser recolectadas del paciente y está asociada con morbilidad y dolor del área donante. También, las células obtenidas de la médula ósea necesitan ser cultivadas y multiplicadas con un procesamiento de tejidos bien manufacturado durante varias semanas para facilitar la generación de células para su uso terapéutico. Este procedimiento es costoso, fuertemente regulado y fundamentalmente cambia la biología de las células⁽²⁶⁾.

Limitaciones como estas y otras, han estimulado el interés en el posible papel terapéutico de las células madre derivadas del tejido adiposo, procesadas a partir del lipoaspirado para muchas aplicaciones, incluidos usos como relleno de tejidos blandos para cirugía plástica y reconstructiva. El tejido adiposo se ha considerado como un órgano de almacenamiento de energía, un órgano endocrino, como un relleno de tejidos blandos y un tejido cosméticamente innecesario, descartado por liposucción. Se considera ahora también una fuente promisoría de células madre adultas, algunas de las cuales pueden diferenciarse en diversos linajes. Con este nuevo enfoque, muchas puertas nuevas ahora se abren para varias estrategias terapéuticas utilizando el tejido adiposo⁽²⁷⁾.

Las células madre derivadas del tejido adiposo se pueden obtener tanto de lipoaspirados como de grasa resecada en bloque. Es importante destacar la facilidad de la cosecha y el gran volumen de este tejido obtenido por liposucción, así como también la propiedad del tejido adiposo en contener de 100 a 1000 veces más células pluripotenciales por centímetro cúbico que la médula ósea⁽²⁸⁾.

Son muchas las razones para sugerir que las células madre derivadas del tejido adiposo, son tal vez la fuente ideal de células para terapias regenerativas de los tejidos blandos. Primero, su multipotencialidad, especialmente su proclividad para la diferenciación adiposa, las hace entonces una atractiva fuente de células. Es relativamente simple conseguir un alto nivel de diferenciación adiposa de células madre derivadas de adipocitos *in vitro* y muchos estudios han desarrollado métodos para usarlos *in vivo*⁽²⁷⁾. También se ha visto que las células madre derivadas de adipocitos tienen un potencial significativo para la angiogénesis, una de las limitaciones fundamentales en la técnica estándar de injerto adiposo autólogo. Y por otra parte, los cirujanos plásticos tienen un significativo nivel de comodidad con la cosecha y manipulación de tejido adiposo⁽²⁹⁾.

Las células madre derivadas del tejido adiposo se cree que actúan como progenitoras de los adipocitos y células vasculares; residen entre los adipocitos, alrededor de los vasos o en la matriz extracelular y contribuyen al recambio celular del tejido adiposo. Algunos estudios sugieren la existencia de una población celular localizada en la pared vascular las cuales se pueden diferenciar entre los vasos, mientras que otros estudios indican una posible identidad similar entre las células madre derivadas del tejido adiposo y los pericitos vasculares. Se ha observado que las células madre derivadas del tejido graso están involucradas en la remodelación microvascular y exhiben un fenotipo perivascular. Recientemente se descubrió en ratones que las células progenitoras de adipocitos están presentes en la vasculatura adiposa como células murales⁽³⁰⁾.

Se ha observado que las células madre derivadas del tejido adiposo, muestran características angiogénicas, como liberación de factores angiogénicos bajo isquemia o estimulación de factores de crecimiento y diferenciación experimental en células vasculares endoteliales. Por lo tanto ahora las células madre derivadas del tejido graso son consideradas células progenitoras biopotentes tanto para células vasculares como para adipocitos⁽³¹⁾.

Las células madre derivadas del tejido graso contribuyen al recambio celular del tejido adiposo y proveen células para la próxima generación. Los adipocitos tienen una vida media útil de 2 a 10 años y son reemplazados por la próxima generación de células derivadas de las células madre provenientes de los adipocitos después de la apoptosis. Las células madre derivadas de los adipocitos se consideran que son una población celular principalmente con capacidad proliferativa en la remodelación del tejido adiposo, así como en el proceso de reparación posterior a lesión por isquemia – reperfusión⁽¹¹⁾.

El tejido adiposo crece en los adolescentes y en personas obesas y se atrofia con la edad o después de una lesión tisular. Este proceso de remodelación se considera que está en balance con la apoptosis/necrosis de adipocitos, tanto fisiológica como incidental y dirige la adipogénesis por las células madre derivadas del tejido adiposo; estos cambios degenerativos y regenerativos a veces están acompañados por remodelación capilar. La atrofia del tejido adiposo con la edad es debida a la disminución de células madre derivadas del tejido adiposo y subsecuentemente afecta el reemplazo en la próxima generación, como se ha observado comúnmente en otros tejidos⁽³²⁾.

Objetivo general

Describir la técnica y experiencia inicial en la realización de lipoinjerto enriquecido con células madre adultas autólogas expandidas *in vitro*, en pacientes con surcos nasogenianos prominentes susceptibles de tratamiento con lipoinjerto en el Hospital Militar Dr. Carlos Arvelo en el período comprendido entre Junio de 2010 a Junio de 2011.

Objetivos específicos

1. Describir la técnica de aislamiento de células madre adultas a partir de lipoaspirado.
2. Describir la técnica de expansión *in vitro* de las células madre adultas autólogas obtenidas a partir de lipoaspirado.
3. Realizar injerto de tejido adiposo enriquecido con células madre adultas autólogas en pacientes con surcos nasogenianos prominentes susceptibles de tratamiento con lipoinjerto.
4. Evaluar los resultados estéticos de la zona tratada a los 6 meses, mediante una escala analógica visual.
5. Evaluar el grado de satisfacción del paciente mediante una escala analógica visual.
6. Correlacionar el número de células estromales expandidas *in vitro* implantadas con los resultados estéticos de la zona tratada a los 6 meses, mediante una escala analógica visual.
7. Determinar las complicaciones inherentes al procedimiento.

Hipótesis

El uso de lipoinjerto autólogo enriquecido con células madre adultas autólogas expandidas *in vitro* permite una mayor supervivencia del volumen del injerto en el tiempo.

MÉTODOS

Tipo de estudio:

El estudio fue de tipo descriptivo, prospectivo, cuasi – experimental.

Población y muestra:

La población la constituyen pacientes con surcos nasogenianos prominentes susceptibles de tratamiento con lipoinjerto.

La muestra estuvo constituida por dieciséis pacientes, con surcos nasogenianos prominentes que acudieron a la consulta del Servicio de Cirugía Plástica, Reconstructiva, Estética y Maxilofacial del Hospital Militar Dr. Carlos Arvelo en el período comprendido entre Junio de 2010 a Junio de 2011. Todas del sexo femenino con edades comprendidas entre los 40 y 58 años. Las pacientes se dividieron al azar en dos grupos (A y B) de ocho pacientes cada uno, al grupo “A” se les realizó lipoinjerto enriquecido con células madre expandidas *in vitro* en ambos surcos nasogenianos y el grupo “B” se les realizó lipoinjerto sin células madre expandidas *in vitro* en ambos surcos nasogenianos.

Criterios de inclusión

1. Pacientes entre 18 y 65 años.
2. Sexo: masculino o femenino.
3. Pacientes con riesgo quirúrgico ASA I – II.
4. Pacientes con surcos nasogenianos prominentes susceptibles de ser tratados con lipoinjerto.
5. Aceptación del consentimiento voluntario informado.

Criterios de exclusión

1. Pacientes con enfermedad oncológica activa.
2. Pacientes alérgicos a la penicilina y/o a la gentamicina.
3. Pacientes con déficit neurológico, inmunosuprimidos, HIV +, con discrasia hematológica.

4. Presencia de comorbilidades sistémicas tales como: Diabetes Mellitus, neuropatías adquiridas o hereditarias, trastornos psiquiátricos.

Técnicas y procedimientos

A las pacientes del grupo “A”, se les realizó liposucción de 60 cc de grasa de la región abdominal, de este lipoaspirado se aislaron las células madre adultas, las cuales se expandieron *in vitro*, estas posteriormente se mezclaron con un nuevo lipoaspirado previamente decantado y se injertó en los surcos nasogenianos. También se les tomó una muestra sanguínea de 20cc de la cual se aisló el suero.

A las pacientes del grupo “B”, se les realizó liposucción de 6 cc de grasa de la región abdominal, el lipoaspirado se decantó y se injertó en los surcos nasogenianos.

Descripción de la Técnica:

Antes de comenzar el procedimiento, se procedió a la antisepsia de la región abdominal con solución de yodo vinilpirrolidona al 5%, el sitio donante se infiltró con 60 cc de solución de Klein, la cual estuvo constituida por solución fisiológica, lidocaína (50 cc al 1% por cada 1000cc), epinefrina (1 cc al 0,001% por cada 1000cc) y bicarbonato de sodio (12,5cc al 8,5% por cada 1000cc). Luego de esperar 10 minutos el tejido adiposo se aspiró con una cánula de 4 mm en su diámetro interno y presión negativa ejercida con una jeringa de 60cc. El lipoaspirado fue llevado refrigerado y en condiciones de esterilidad hasta el laboratorio de Bioingeniería de Tejidos de la Universidad Simón Bolívar, donde se procesó para aislar y luego amplificar las células madre contenidas en este tejido.

Método de aislamiento y replicación *in vitro* de Células madre.

Se utilizó el protocolo de extracción de células estromales de tejido adiposo obtenido por liposucción del laboratorio de bioingeniería de tejidos de la Universidad Simón Bolívar. Este consistió en centrifugación del lipoaspirado a 3000 r.p.m. por 5 minutos (Figuran°1), luego se procedió a retirar el sobrenadante y se tomó la capa intermedia con pipeta de Pasteur y se colocó en tubos de 15 cc con tapa, (Figuran°2). El tejido

se mezcló para la digestión, con solución DMEM más 0,25 mg/ml de colagenasa más 0,05 mM de EDTA lo cual se incubó a 37°C en agitación continua por 40 minutos (Figura n° 3). Luego este tejido digerido se centrifugó a 3000 r.p.m. por 5 minutos y se separó en dos capas quedando en la capa superior las células adiposas y las células estromales precipitaron al fondo (Figura n° 4). Se retiró el sobrenadante y a las células precipitadas en el fondo se les agregó DMEM complementado, se centrifugó y se volvió a resuspender en medio DMEM complementado (Figura n° 5). Se sembraron en cápsulas de Petri y se incubaron a 37°C y 5% de CO₂ con el lisado plaquetario obtenido a partir de plasma del paciente (Figura n° 6).

Técnica de Lipoinjerto:

Una vez multiplicadas la células se realizó otro lipoaspirado, pero con una cánula de 2mm y jeringa de 10 cc, se dejó decantar y se obtuvieron 6 cc de grasa. Este material se mezcló con las células madre adultas autólogas previamente expandidas *in vitro* (Figura n°7). La mezcla se cargó en jeringas de 1 cc. Posteriormente se realizó infiltración de lidocaína al 1% en la parte más alta del surco nasogeniano y una punción con una aguja 14g para introducir la cánula de 2mm (Figura n° 8). Se rellenó la fosa piriforme y el 1/3 superior del surco nasogeniano (Figura n° 9). El área de punción se cubrió con adhesivo de papel microporoso.

El seguimiento postoperatorio se realizó a las 24 horas, y al cumplirse las semanas 1°, 4°, 8° y al finalizar el sexto mes luego del tratamiento. La evaluación de los resultados estéticos de la zona tratada se realizó mediante una escala analógica visual. La cual varía en el rango de 0 cuando no existen cambios en la zona tratada y 10 cuando los cambios son evaluados como excelentes ⁽³³⁾ (Figura n° 10). El grado de satisfacción del paciente se evaluó con una escala analógica visual⁽³³⁾, la cual varía del 0 cuando la aceptación fue mala a 10 cuando la aceptación fue excelente (Figura n°11).

Tratamiento estadístico adecuado

Se calculó la media y la desviación estándar de las variables continuas; en el caso de las variables nominales se calculó sus frecuencias y porcentajes.

Se determinó la Normalidad de EVA (de estética y de satisfacción) mediante la prueba no paramétrica Kolmogorov-Smirnoff.

Para conocer si existía variabilidad intraobservador en las mediciones de estética respecto entre los adjuntos que participaron en el estudio, se aplicó la prueba ANOVA de una vía.

Se aplicó la prueba t de Student para muestras independientes para determinar las diferencias entre grupos de EVA estética y de satisfacción.

Se consideró un valor estadístico significativo si $p < 0,05$. Los datos fueron analizados con JMP-SAS 9.

RESULTADOS

Se estudiaron dieciséis pacientes todos del sexo femenino, con edad promedio de 48,6 años (40 – 58 años)

Con la evaluación por medio de la escala analógica visual se observaron cambios satisfactorios importantes a los 6 meses del postoperatorio, sin embargo, de acuerdo al análisis de varianza de una vía, tanto del grupo de pacientes tratadas con células madre como del grupo control, no hay diferencias estadísticas significativas entre las mediciones de los resultados estéticos de acuerdo a la observación entre los evaluadores (Tabla 1 y Gráfico 1).

Hay diferencias estadísticas significativas en la escala estática ($p = 0,004$) entre los grupos analizados, el grupo con células madre reportó una escala de $7,57 \pm 1,11$ mientras que en el grupo control fue $5,14 \pm 1,168$. En el caso de la satisfacción de las pacientes, se reportó un valor promedio alto de $9,25 \pm 0,89$ en el grupo de células madre y en el grupo control fue de $7,00 \pm 0,76$, con diferencias significativas entre los grupos ($p = 0,000$) (Tabla 2 y Grafico 2).

Del total de pacientes de ambos grupos sometidas a lipoinyección solo una, la cual representa el 6,25% del total de pacientes tratadas, presentó como complicación equimosis.

De acuerdo al resultado, no hay correlación lineal significativa entre el número de células implantadas y el resultado estético, el resultado evidencia que se trata de un falso negativo, es decir, aunque se sabe del hecho de la correlación positiva y significativa a que mayor células implantadas hay mejor resultado estético, la evidencia del dato dice lo contrario, el resultado no se debe al procedimiento sino al tamaño de muestra insuficiente (Tabla 3 y Grafico 3).

DISCUSIÓN

La terapia celular es una tecnología en la cual células somáticas vivas, autólogas, alogénicas o xenogénicas, son transplantadas en pacientes, con propósito terapéutico, diagnóstico o preventivo. Luego de avances recientes en investigaciones acerca de las células madre, la terapia celular ha sido aplicada para asistir la revascularización de tejido transplantado como también de heridas en proceso de cicatrización⁽²⁶⁾.

La lipotransferencia autóloga es utilizada para rellenar tejidos blandos y contornear defectos y tiene la ventaja sobre otras técnicas de trasplante en que el material transplantado es relativamente económico, fácil de manipular, disponible en grandes cantidades y autogénico lo cual elimina el alto potencial de riesgo asociado con rellenos alogénicos e implantes.

En la actualidad se ha demostrado que las células mesenquimales, adipocitos derivados de las células madre y células progenitoras endoteliales, pueden todas promover la revascularización del tejido isquémico. Comparado con otras fuentes, los adipocitos derivados de las células madre son ideales por muchos aspectos: son fácilmente recolectadas y manipuladas, al igual que se pueden multiplicar rápidamente in vitro no invasivamente y de manera efectiva. Además de ello, se ha demostrado que tienen características angiogénicas y poder de diferenciación en células endoteliales vasculares en trabajos experimentales^(16,30).

El tejido graso es un largo y difuso tejido con alta actividad metabólica. Estudios histológicos han sugerido que la revascularización de grasa autóloga transplantada solo ocurre luego de 48 horas. Esta demora parece perjudicar críticamente la sobrevivencia de los adipocitos, los cuales atraviesan por cambios degenerativos incluyendo la destrucción de su núcleo y las membranas celulares. Luego de esta destrucción, las vacuolas grasas se desarrollan y la grasa se absorbe gradualmente⁽²⁵⁾.

De esta manera, la neovascularización temprana y abundante parece ser la clave del éxito para la supervivencia de los implantes de grasa, lo cual lleva a su vez la obtención de buenos resultados.

Estas observaciones juntas nos llevaron a examinar si la grasa para ser transplantada, mezclada con células madre derivadas de adipocitos mejorarían la supervivencia de la misma.

Se evidenció en nuestro estudio que a diferencia con otros autores de la literatura, no obtuvimos diferencias estadísticamente significativas entre las mediciones de los resultados estéticos entre especialistas en la materia; no se observó diferencia clínicamente significativa entre el grupo de pacientes a quienes le realizamos lipoinyección de ambos surcos nasogenianos enriquecidos con células madre adultas en comparación con aquellas pacientes a quienes se les inyectó grasa autóloga solamente.

Sin embargo es importante tomar en consideración que este análisis de resultados fue llevado a cabo mediante pruebas de evaluación analógicas, las cuales no tienen alto valor de confiabilidad si los comparamos con estudios como el de Feng Lu y colaboradores ⁽³⁴⁾, quienes demostraron que mezclando el tejido graso con células madre derivadas de adipocitos, antes de realizar la infiltración grasa, aumentaba significativamente la densidad capilar y la viabilidad. Aunque no quedó bien claro como las células madre reforzaron la supervivencia de la grasa transplantada. Sustentaron las siguientes posibilidades: Primero, algunas de las células endoteliales CD31-positivo en el tejido graso fue Dil-positivo, (Dil: Marcador de Células madre provenientes de adipocitos ⁽³⁴⁾), lo cual indica que estas células se han diferenciado de las células madre derivadas del tejido graso. La diferenciación de las células madre provenientes de tejido graso, en células endoteliales vasculares puede promover la angiogénesis que incrementa la supervivencia del trasplante. Segundo, detectaron la diferenciación adipogénica de las células madre (DIL- marcadas), en el tejido graso que sobrevivió, lo cual indica que algunos de los adipocitos habían

derivado del tejido graso exógeno proveniente de las células madre. Debido a la diferenciación de algunas células madre en adipocitos maduros que parcialmente constituyen el trasplante graso, podrían compensar cualquier pérdida temprana de adipocitos trasplantados. Tercero, se plantea que las células madre secretoras de VEGF incentivaron la sobrevida de la grasa trasplantada, es posible que las condiciones de hipoxia a las cuales estuvieron sometidas estas células madre luego del trasplante, las indujo a liberar factores angiogénicos solubles, tales como, VEGF, lo cual promovió a la neovascularización temprana del injerto y estimuló a la sobrevida de los adipocitos.

Las terapias, celular y genética, han demostrado ser efectivas para promover la neovascularización en varios modelos animales ⁽²²⁾. Estas dos tipos de terapias pueden ser útiles también cuando se emplean juntas, De hecho se ha demostrado que combinando células madre provenientes de tejido adiposo con células que sobre expresan genes VEGF lograron un mejor efecto que usando células madre provenientes de tejido adiposo solas. Se debe resaltar, de cualquier manera, que en la actualidad no es posible usar terapias de genes que involucren células transfectadas en aplicaciones clínicas ⁽²⁸⁾.

De la misma manera se siguió con el protocolo de trabajo de investigadores que demostraron la diferencia entre lipotransferencia con o sin células madre adultas alogénicas. Partiendo de este punto, se utilizaron técnicas para la recolección, manejo, cultivo y reproducción celular e incluso para la administración de la grasa ⁽³⁵⁾.

Para la obtención del tejido graso se utilizaron los métodos más populares en recolección y preparación de la grasa para aumentar consistentemente la viabilidad del injerto. No se demostró en estudios previos ninguna mejoría significativa en la viabilidad celular cuando se utilizaron como método de obtención, aspiración con jeringa u otras técnicas de succión.

El tejido adiposo puede ser abundante en la anatomía humana y puede ser fácilmente obtenido utilizando técnicas de liposucción convencionales. La grasa es inconsistente por sí misma y actúa como un filtro defectuoso, el tejido adiposo puede proveer una fuente de células madre las cuales pueden ser capaces tanto de garantizar el injerto así como proveer lo básico para alguna otra estrategia de reparación o regeneración del tejido blando.

Modificaciones en las técnicas de lipoinyección para mejorar el rango de sobrevivencia de la grasa inyectada, se han llevado a cabo. Partiendo de este punto, es bien aceptado que el tejido adiposo debe ser colocado en pequeñas alícuotas, preferiblemente entre un área de 3 mm de diámetro. Porque demora un tiempo largo realizar una distribución difusa ideal de grasa succionada.

Nosotros hemos utilizado jeringas descartables con sistema de rosca y trancas para el émbolo y conexiones, con agujas largas de 150mm, un asistente para rotar la tranca del émbolo. Como resultado, solamente entre 10 y 15 minutos fueron requeridos para la infiltración de ambos surcos nasogenianos. Aunque estos dispositivos son críticos para realizar lipoinyecciones de gran volumen de una manera segura y en un tiempo corto, para este estudio fueron de gran utilidad y seguridad.

La reabsorción de la grasa lipoinyectada ha sido siempre un punto importante cuando se realiza lipotransferencia. Peer y otros investigadores han encontrado que la grasa auto transplantada pierde un promedio de acerca el 50% de su peso y volumen luego de ser transplantada. Para asegurar la viabilidad del lipoinjerto se siguieron los siguientes tratados publicados por Abel Chajchir y colaboradores ⁽³⁶⁾:

- 1) La anestesia local no está recomendada por los cambios en la estructura anatómica del tejido por incrementar el volumen con el fluido anestésico y por el efecto vasoconstrictor de la epinefrina en el área receptora.

- 2) El manejo de la grasa debe ser delicado para evitar la destrucción de los glóbulos de grasa.
- 3) No se debe sumergir la grasa en solución salina. Esta acción cambiaría la morfología natural del tejido graso y causaría una pérdida de fibrina, lo cual ocasiona adhesión del material inyectado al tejido adyacente.
- 4) Sólo inyecciones de tejido sano deberían realizarse. Adipocitos destruidos, grasa o sangre debe ser separado del tejido y descartados.
- 5) La reabsorción en algunas áreas puede ser causada por disminución en la vascularización, como resultado de procedimientos de liposucción previa.
- 6) Se debe advertir a los pacientes de la necesidad de la sobrecorrección, el tiempo de recuperación, las posibles complicaciones impredecibles y de que varios procedimientos pueden ser requeridos para que la lipoinyección sea la deseada.

Con este novedoso tratamiento, las células madre tienen cuatro posibles roles, los cuales han sido parcialmente confirmados en los estudios pre clínicos. Primero, se pueden diferenciar en adipocitos y contribuir a la regeneración del tejido adiposo. Segundo, se pueden diferenciar en células endoteliales y también probablemente en células del parenquima vascular. Resultando la promoción de la angiogénesis y la sobrevivencia del injerto. Tercero, las células madre son conocidas por liberar factores de crecimiento angiogénicos en respuesta a la hipoxia y otras condiciones, y estos factores influyen en los alrededores del tejido receptor. En su último rol, el cual podría ser el más importante, las células madre sobreviven como células madre originales. En el tejido adiposo, residen entre adipocitos y matriz extracelular, especialmente alrededor de los vasos, y contribuyen al recambio del tejido adiposo, el cual se ha demostrado que es muy lento (2 años o más). De cualquier manera, los injertos grasos probablemente se recambian durante 2 o 3 meses después de su transplante porque experimentan isquemia temporal seguida de daño por reperfusión.

El tejido que sigue al proceso de la necrosis grasa, muestra una reacción crítica en extensión que mantiene la forma y el volumen deseado del área por un tiempo

considerable. La textura de la piel es mejorada por la neovascularización observada en todas las áreas inyectadas. Las características importantes en términos de sobrevivencia del material injertado es la integridad anatómica e histológica de los glóbulos de grasa. En pacientes con gran cantidad de reabsorción, una segunda lipoinyección está indicada.

También pudimos apreciar en nuestro estudio como las pacientes del grupo experimental, tuvieron una percepción más favorable ante los resultados finales, que el grupo control. Esto lo podríamos relacionar a la predisposición que existió al saber que su grasa fue cultivada para la obtención de las células madre. En este caso la muestra si fue estadísticamente significativa.

CONCLUSIONES

El aislamiento de células madres adultas a partir del tejido adiposo es un método viable.

La replicación *in vitro* de las células madre derivadas del lipoaspirado es factible en nuestro medio.

El tratamiento de los surcos nasogenianos prominentes con lipoinjerto es un método poco costoso, lo cual contrasta con el enriquecimiento de los lipoinjertos con células madre autólogas y con el tratamiento a base de materiales aloplásticos.

El grado de satisfacción de las pacientes tratadas con lipoinjertos enriquecidos con células madre autólogas fue mayor, probablemente debido a un efecto placebo.

La falta de correlación positiva entre el número de células estromales expandidas *in vitro* implantadas con los resultados estéticos fue debida al tamaño de la muestra.

Las complicaciones inherentes al procedimiento son mínimas.

RECOMENDACIÓN

Recomendamos continuar con este protocolo de lipoinjerto enriquecido con células madre expandidas *in vitro* con un mayor número de casos.

REFERENCIAS

1. Yoshimura, K. Suga, H. Eto, H. Adipose-derived stem/progenitor cells: roles in adipose tissue remodeling and potential use for soft tissue augmentation. *Regen med* 2009 Mar;4(2):265-73.
2. Vermette, M. Trottier, V. Ménard, V. , Saint-Pierre, L. Roy, A. Fradette, J. Production of a new tissue-engineered adipose substitute from human adipose-derived stromal cells. *Biomaterials*. 2007 Jun;28(18):2850-60.
3. Patrick Jr CW. Tissue engineering strategies for adipose tissue repair. *Anat Rec* 2001;263(4):361–6.
4. Billings E Jr, May JW Jr. Historical review and present status of free fat graft autotransplantation in plastic and reconstructive surgery. *Plast Reconstr Surg*. 1989 Feb;83(2):368-81.
5. Niechajev, I., and Sevcuk, O. Long-term results of fat transplantation: Clinical and histologic studies. *Plast. Reconstr. Surg.* 94: 496, 1994.
6. Illouz, Y. G. The fat cell “graft”: A new technique to fill depressions. *Plast. Reconstr. Surg.* 78: 122, 1986.
7. Smith P, Adams WP Jr, Lipschitz AH, Chau B, Sorokin E, Rohrich RJ, Brown SA. Autologous human fat grafting: effect of harvesting and preparation techniques on adipocyte graft survival. *Plast Reconstr Surg*. 2006 May;117(6):1836-44.
8. Muthukrishnan L, Warder E, McNeil PL: Basic fibroblast growth factor is efficiently released from a cytosolic storage site through plasma membrane disruptions of endothelial cells. *J. Cell Physiol.* 148(1), 1–16 (1991).
9. Aiba-Kojima E, Tsuno NH, Inoue K *et al.*: Characterization of wound drainage fluids as a source of soluble factors associated with wound healing: comparison with platelet-rich plasma and potential use in cell culture. *Wound Repair Regen.* 15(4), 511–520 (2007).
10. Mylotte LA, Duffy AM, Murphy M *et al.*: Metabolic flexibility permits mesenchymal stem cell survival in an ischemic environment. *Stem Cells* 26(5), 1325–1336 (2008).
11. Suga H, Eto H, Shigeura T *et al.*: IFATS collection: FGF-2-induced HGF secretion by adipose-derived stromal cells inhibits post-injury fibrogenesis through a JNK-dependent mechanism. *Stem Cells* 27(1), 238–249 (2009).

12. Shiffman, M. A., and Mirrafati, S. Fat transfer techniques: The effect of harvest and transfer methods on adipocyte viability and review of the literature. *Dermatol. Surg.* 27: 819, 2001.
13. Nguyen, A., Pasyk, K. A., Bouvier, T. N., Hassett, C. A., and Argenta, L. C. Comparative study of survival of autologous adipose tissue taken and transplanted by different techniques. *Plast. Reconstr. Surg.* 85: 378, 1990.
14. Niechajev, I., and Sevcuk, O. Long-term results of fat transplantation: Clinical and histologic studies. *Plast. Reconstr. Surg.* 94: 496, 1994.
15. Guerrerosantos, J. Autologous fat grafting for body contouring. *Clin. Plast. Surg.* 23: 619, 1996.
16. Moseley TA, Zhu M, Hedrick MH. Adipose-derived stem and progenitor cells as fillers in plastic and reconstructive surgery. *Plast Reconstr Surg.* 2006 Sep;118(3 Suppl):121S-128S.
17. Carpaneda, C. A., and Ribeiro, M. T. Percentage of graft viability versus injected volume in adipose autotransplants. *Aesthetic Plast. Surg.* 18: 17, 1994.
18. Hedrick, M. H., and Daniels, E. J. The use of adult stem cells in regenerative medicine. *Clin. Plast. Surg.* 30: 499, 2003.
19. Bosi, A., Bartolozzi, B., and Guidi, S. Allogeneic stem cell transplantation. *Transplant. Proc.* 37: 2667, 2005.
20. Dickinson, A. M., and Charron, D. Non-HLA immunogenetics in hematopoietic stem cell transplantation. *Curr. Opin. Immunol.* 17: 517, 2005.
21. Sommer, B., and Sattler, G. Current concepts of fat graft survival: Histology of aspirated adipose tissue and review of the literature. *Dermatol. Surg.* 26: 1159, 2000.
22. Har-Shai, Y., Lindenbaum, E. S., Gamliel-Lazarovich, A., Beach, D., and Hirshowitz, B. An integrated approach for increasing the survival of autologous fat grafts in the treatment of contour defects. *Plast. Reconstr. Surg.* 104: 945, 1999.
23. Coleman, S. R. Facial recontouring with lipostructure. *Clin. Plast. Surg.* 24: 347, 1997.
24. D'Ippolito, G., Schiller, P. C., Ricordi, C., Roos, B. A., and Howard, G. A. Age-related osteogenic potential of mesenchymal stromal stem cells from human vertebral bone marrow. *J. Bone Miner. Res.* 14: 1115, 1999.

25. Fortier, L. A. Stem cells: Classifications, controversies, and clinical applications. *Vet. Surg.* 34: 415, 2005.
26. Vacanti, V., Kong, E., Suzuki, G., Sato, K., Canty, J. M., and Lee, T. Phenotypic changes of adult porcine mesenchymal stem cells induced by prolonged passaging in culture. *J. Cell. Physiol.* 205: 194, 2005.
27. Strem, B. M., and Hedrick, M. H. The growing importance of fat in regenerative medicine. *Trends Biotechnol.* 23: 64, 2005.
28. Strem, B. M., Hicok, K. C., Zhu, M., et al. Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells. *Keio J. Med.* 54: 132, 2005.
29. De Ugarte, D. A., Ashjian, P. H., Elbarbary, A., and Hedrick, M. H. Future of fat as raw material for tissue regeneration. *Ann. Plast. Surg.* 50: 215, 2003.
30. Zengin E, Chalajour F, Gehling UM *et al.*: Vascular wall resident progenitor cells: a source for postnatal vasculogenesis. *Development* 133(8), 1543–1551 (2006).
31. Tang W, Zeve D, Suh JM *et al.*: White fat progenitor cells reside in the adipose vasculature. *Science* 322(5901), 583–586 (2008).
32. Caplan AI: Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. *J. Cell. Physiol.* 213(2), 341–347 (2007).
33. Quiles MJ, van-der Hofstadt C J, Quiles Y. Pain assessment tools in pediatric patients: a review (2nd part). *Rev Soc Esp Dolor* 2004; 11: 360-369.
34. Feng Lu, Jie Li, JianHua Gao, Rei Ogawa, Chunquan Ou. Improvement of the Survival of Human Autologous Fat Transplantation by Using VEGF-Transfected Adipose-Derived Stem Cells. *Plast. Reconstr. Surg.* 2009; 124: 1437.
35. Timothy A. Moseley, Min Zhu, Marc H. Hedrick. Adipose-Derived Stem and Progenitor Cells as Fillers in Plastic and Reconstructive Surgery. *Plast. Reconstr. Surg* 2006; 118 (Suppl.): 121S.
36. Chajchir A., Benzaquen I. Fat Grafting Injection for soft – tissue augmentation. *Plastic and Reconstructive Surgery*; 921-34 (1989)

ANEXOS



Figura n° 1. Lipoaspirado posterior a ser centrifugado.



Figura n° 2. Separación de la capa intermedia del lipoaspirado ya cetrifugado.



Figura nº 3. Tejido graso incubado con colagenasa bajo agitación continúa.



Figura nº 4. Tejido graso digerido posterior a la centrifugación, flecha amarilla señala las células estromales precipitadas.



Figura n° 5. Células estromales resuspendidas en medio DMEM complementado con lisado plaquetario autólogo.

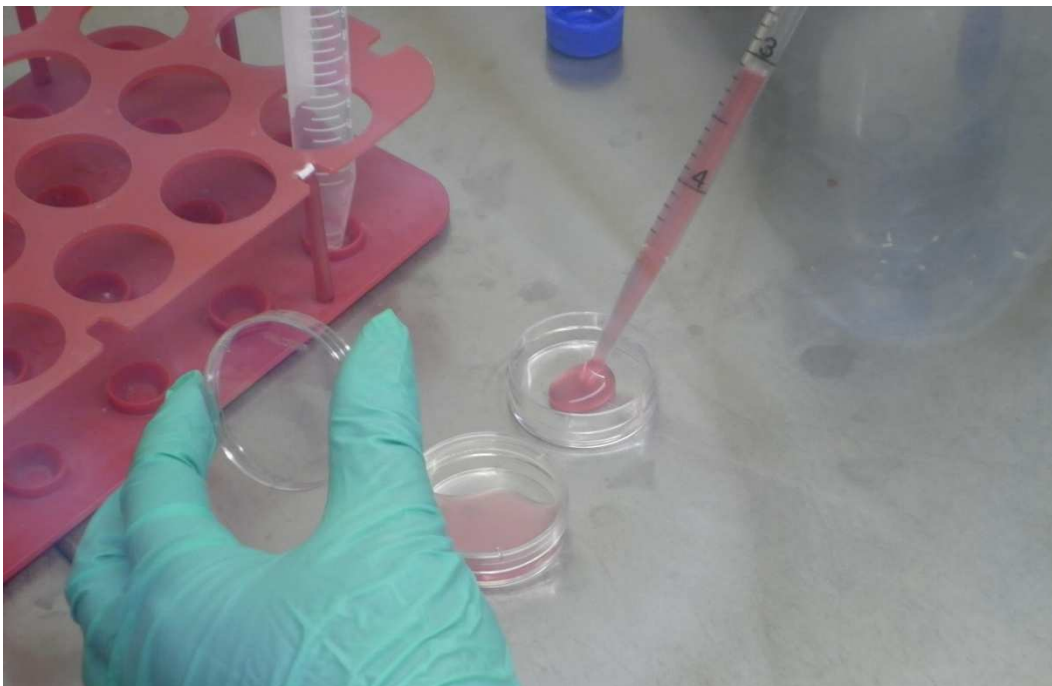


Figura n° 6. Sembrado en placas de cultivo de células estromales previamente resuspendidas en medio DMEM complementado con lisado plaquetario autólogo.



Figura n° 7. Mezcla del lipoaspirado con las células madre adultas autólogas expandidas *in vitro*.



Figura n° 8 Anestesia infiltrativa con lidocaína al 1% en el sitio de punción.

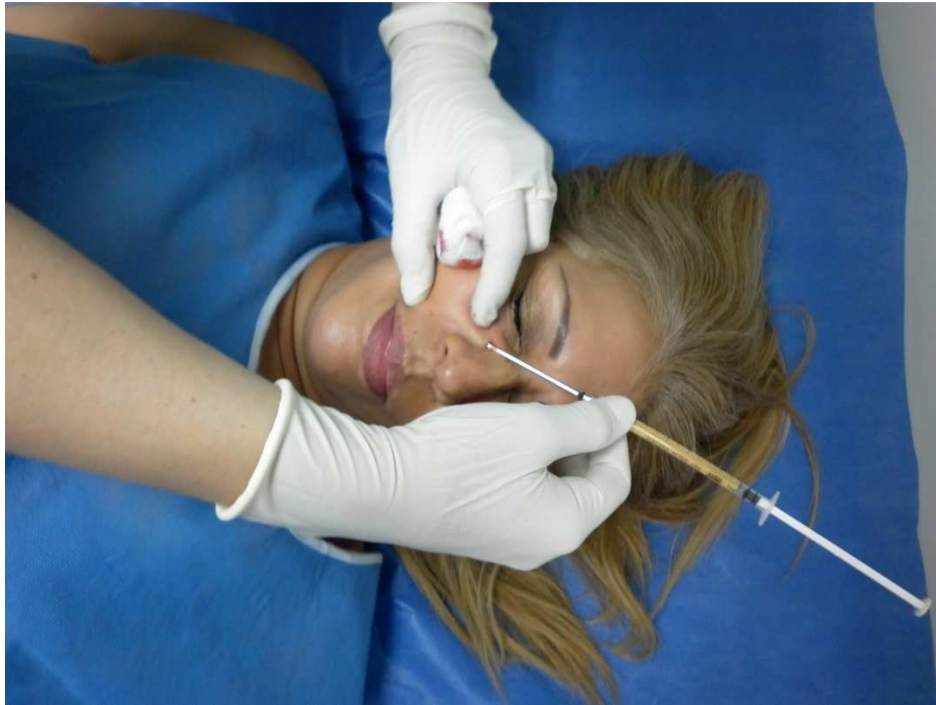


Figura n° 9 Relleno de los surcos nasogenianos con lipoinjerto enriquecido con células madre autólogas expandidas *in vitro*.

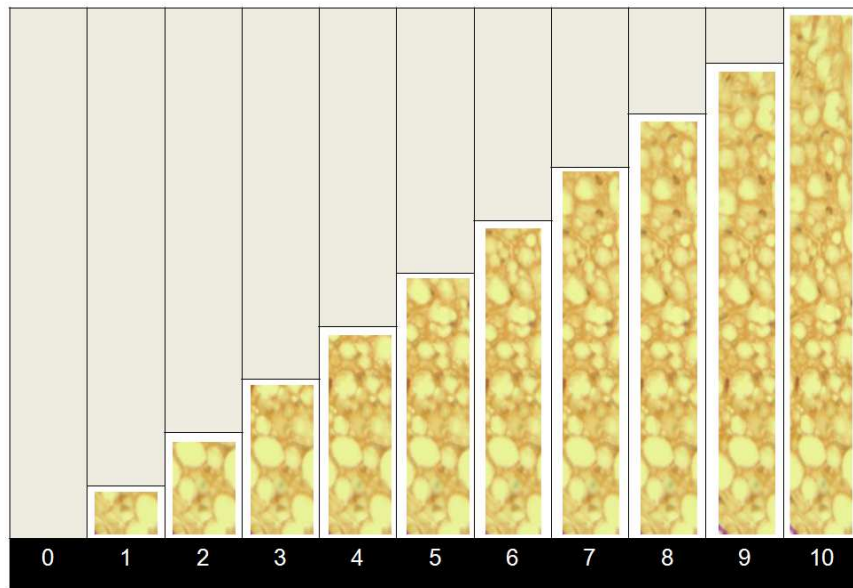


Figura n° 10. Escala analógica visual para la evaluación de los resultados estéticos de la zona tratada.

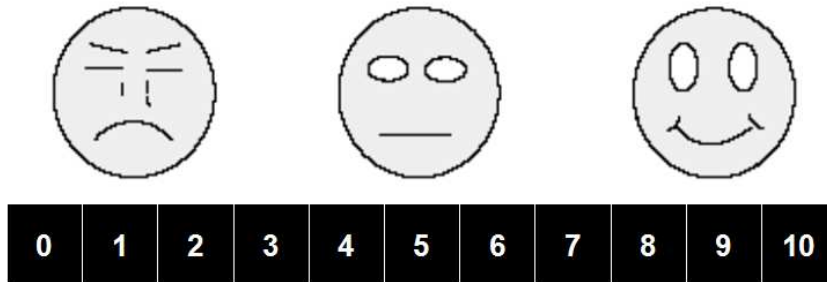


Figura n° 11. Escala analógica visual para la evaluación del grado de aceptación del procedimiento por parte del paciente.

Tabla 1.
Medida intraobservadores de los resultados estéticos del grupo tratado con lipoinjerto enriquecido con células madre adultas autólogas expandidas *in vitro*.

Adjunto	Células madre		Control	
	Media	DE	Media	DE
1	7,88	1,96	4,00	2,78
2	8,25	1,39	7,63	1,06
3	7,75	1,28	4,50	2,56
4	7,75	1,67	5,63	2,56
5	6,63	1,85	4,88	2,53
6	7,25	1,49	5,38	2,45
7	7,50	2,33	4,00	2,62

Células madre: $F = 0,712$ ($p = 0,642$)

Control $F = 2,161$ ($p = 0,063$)

Gráfico 1.

Diagrama de caja de la Escala Visual Análoga (estética) según grupos.

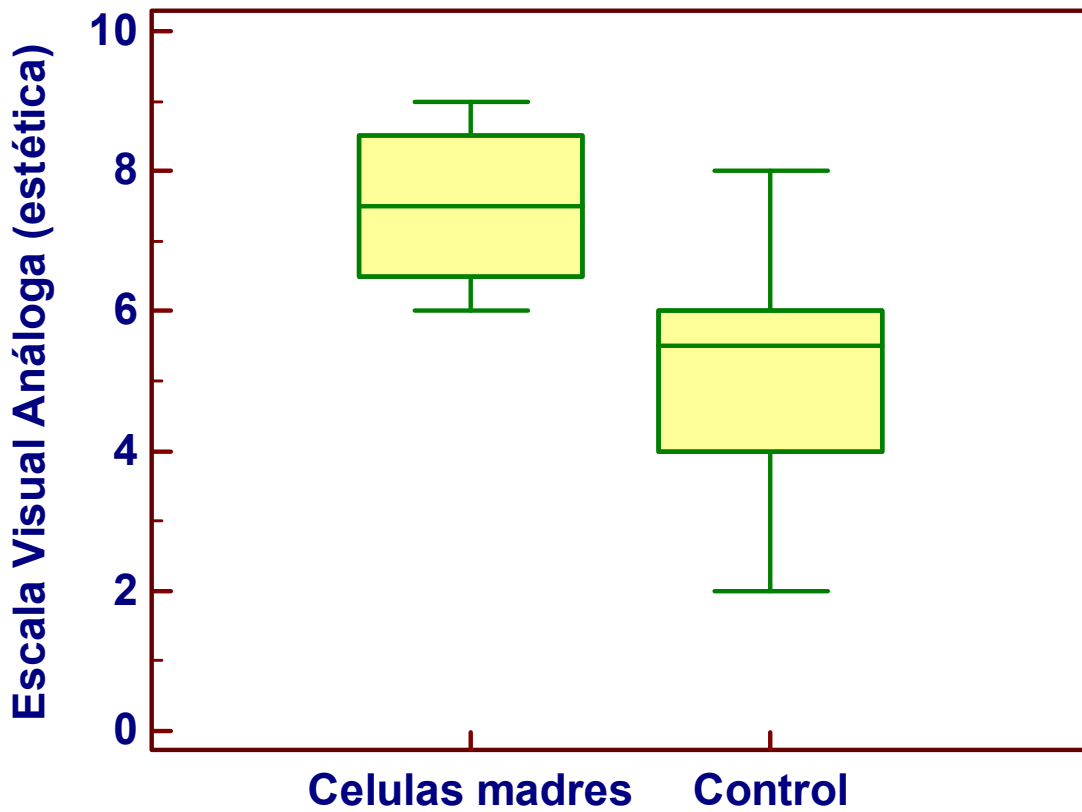


Tabla 2.

Comparación del renglón de estética y satisfacción.

Variables	Células madres	Control	P
N	8	8	-
Estética	7,57 ± 1,11	5,14 ± 1,68	0,004
Satisfacción	9,25 ± 0,89	7,00 ± 0,76	0,000

Gráfico 2.

Diagrama de caja de la Escala Visual Análoga (satisfacción) según grupos.

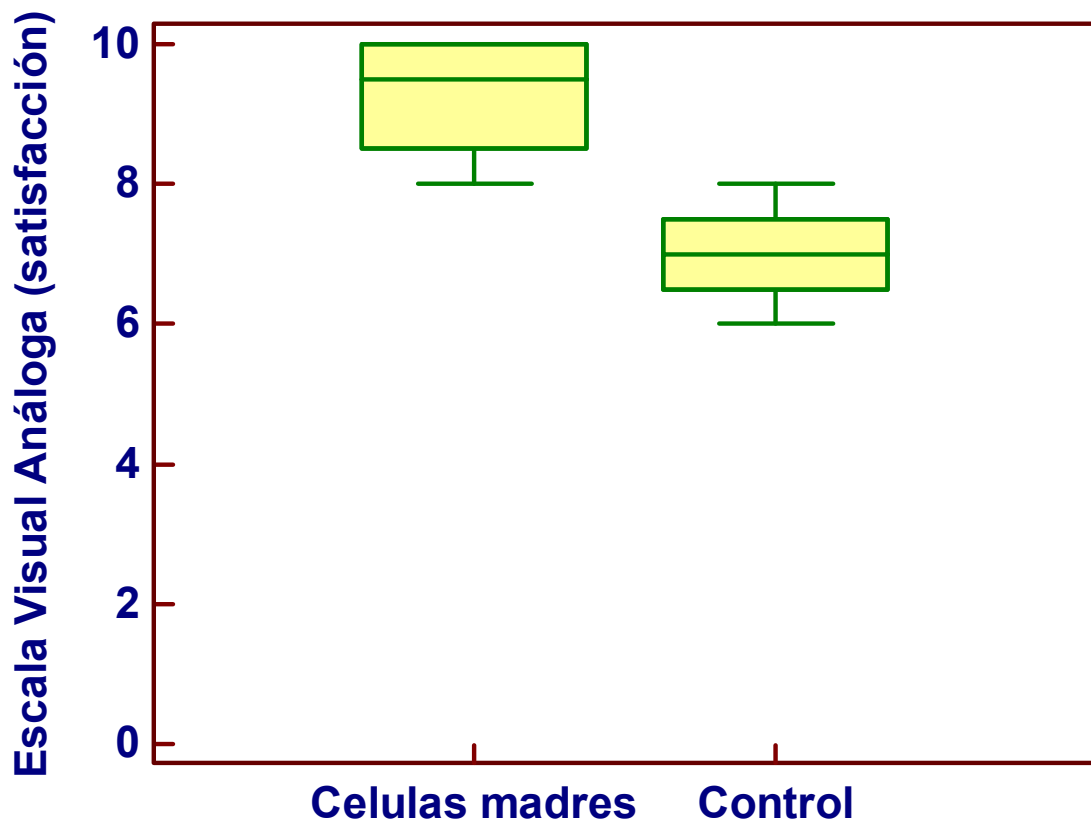


Tabla 3.

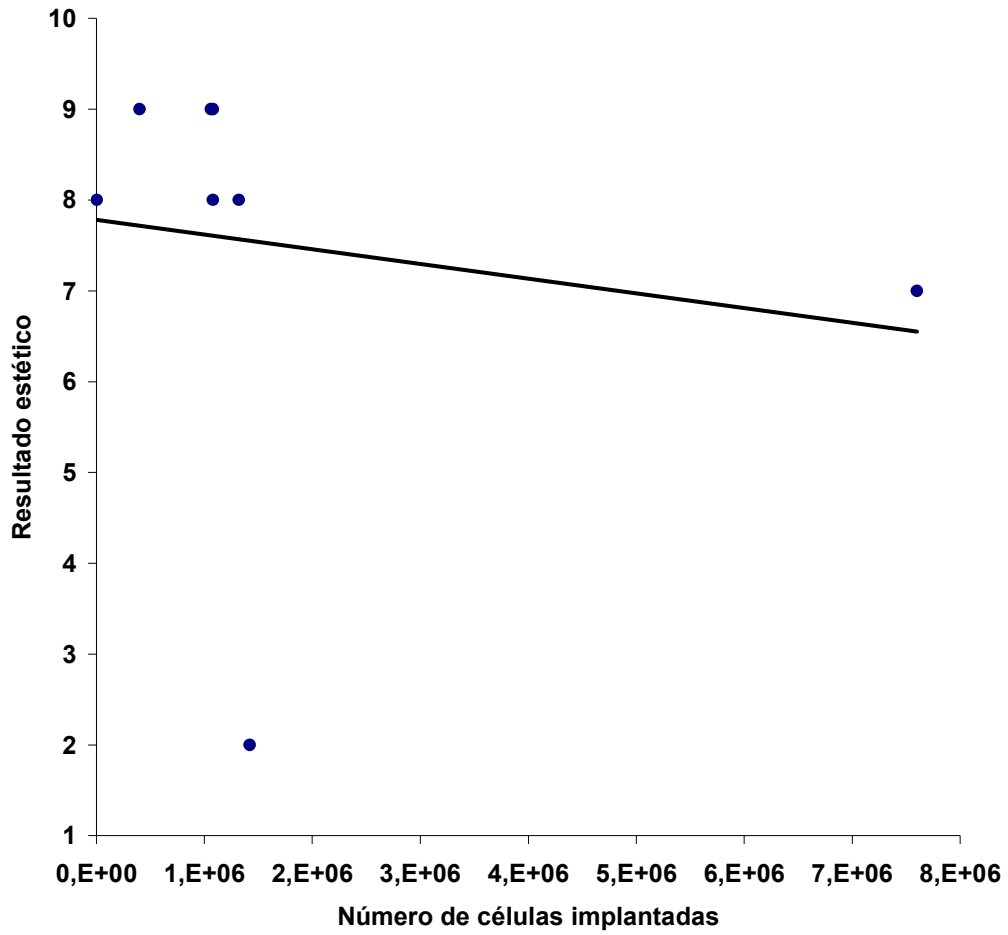
Correlación entre el número de células implantadas y el resultado estético

Paciente	N° de células implantadas	Resultado Estético
1	1,08 x 10 ⁶	8
2	0,4 x 10 ⁶	9
3	7,60 x 10 ⁶	7
4	1,42 x 10 ⁶	2
5	1,06x 10 ⁶	9
6	1,08 x 10 ⁶	9
7	1,32 x 10 ⁶	8
8	0,005 x 10 ⁶	8

r = -0,168 (p = 0,692)

Gráfico 3.

Correlación entre el número de células implantadas y el resultado estético.



CONSENTIMIENTO VOLUNTARIO INFORMADO

Paciente: _____ Fecha: / / . Hora: am/pm

1-. Por la presente autorizo a el Dr. Aquiles Siverio y al Dr. Gerardo Toro además de los asistentes de su elección a realizar en mí, la siguientes técnicas quirúrgicas: **Utilización de tejido adiposo enriquecido con células madre adultas autólogas para lipoinjerto**. El objetivo de esta investigación es permitir la multiplicación de células madre para poder formar células de grasa que permitirán como relleno en áreas específicas del cuerpo que lo ameriten

2-. El Dr. Aquiles Siverio y/o el Dr. Gerardo Toro me han explicado la naturaleza y propósitos de la técnica o procedimiento especial, también me ha informado de las ventajas, complicaciones, molestias, riesgos que pueden producirse, tiempo de duración de la investigación, así como las posibles alternativas al tratamiento propuesto. Se me ha dado la oportunidad de hacer preguntas y todas mis preguntas han sido contestadas satisfactoriamente.

3-. Entiendo que en el curso de la realización de la técnica o procedimiento especial, pueden presentarse situaciones imprevistas que requieran procedimientos adicionales. Por lo tanto, autorizo la realización de estos procedimientos si los médico arriba mencionados o los asistentes lo juzgan necesario.

4-. Autorizo la transfusión o la administración de sangre o sus componentes durante mi procedimiento y hospitalización, cuando el médico o sus asistentes lo consideren necesario, sin garantías relacionadas con la sangre o sus componentes.

5-. Acepto la presencia de representantes técnicos solicitados por el cirujano durante el procedimiento, para prestar servicios de soporte relacionados con su investigación.

6-. Autorizo que otro personal médico observe mi cirugía con fines educativos.

7-. Autorizo que sean tomadas fotografías requeridas por los cirujanos respetando siempre los principios de privacidad.

8-. Autorizo al médico anesthesiólogo a administrar los anestésicos que se consideren necesarios. Reconozco que siempre hay riesgo para la vida y la salud asociados con la anestesia y dichos riesgos me han sido explicados por el anesthesiólogo.

9-. Reconozco que no se han garantizado los resultados que se esperan de la intervención quirúrgica o procedimiento especial.

10-. Reconozco que mi participación en este estudio de investigación es voluntario y que me puedo retirar del mismo en el momento que así lo decida.

11-. Certifico que he leído y comprendo perfectamente lo anterior y que todos los espacios en blanco han sido completados antes de mi firma, y que me encuentro en capacidad de expresar mi libre albedrío.

Nombre del Paciente

Firma del Paciente

Nombre del Testigo

Firma del Testigo

Médico Tratante

Firma del Médico tratante

Operacionalización de variables:

Nombre	Descripción	Tipo de Variable	Escala de Medición	Valores Posibles
Edad	Tiempo desde la fecha de nacimiento hasta el momento del estudio	Cuantitativa	De Razón	Promedio y desviación en Años
Sexo	Genero del paciente	Cualitativa	Nominal	Masculino Femenino
Resultado estético	Valoración del grado de disminución del surco nasogeniano después del procedimiento por parte del médico	Cuantitativo	De Razón	0 a 10
Grado de satisfacción del procedimiento	Valoración del grado de disminución del surco nasogeniano después del procedimiento por parte del paciente	Cuantitativo	De Razón	0 a 10
Número de células implantadas	Valor del número de células estromales multiplicadas ex vivo con las que se enriquecieron los lipoinjertos	Cuantitativo	De Razón	$0,005 \times 10^6$ a $7,60 \times 10^6$
Complicaciones	Tipo de complicaciones inherentes a la cirugía	Cualitativa	Nominal	Hemorragia Equimosis Hematoma Seroma Infección

FORMATO DE RECOLECCION DE RESULTADOS

FASE 1: PRE OPERATORIA:

HISTORIA CLINICA:

Nº

Nombre: _____ Edad:

_____ C.I. _____

Nº de historia Clínica _____

Dirección _____

Telefonos: _____

Motivo de Consulta: _____

Enfermedad Actual:

Antecedentes: _____

Examen Físico: Peso: _____ Talla: _____ IMC: _____.

Localización del defecto:

Etiología del defecto: _____

Medidas del defecto (cc³) _____

Paraclínicos: _____

DIAGNOSTICO: _____

Observaciones: _____

Grado de inconformidad con aspecto físico (puntaje 0-10):

FICHA RECOLECTORA DE DATOS

Fecha del lipoaspirado: / /

Número de Historia: _____

Nombre y Apellido: _____

Sexo: _____ Edad: _____ Telf: _____

Dirección: _____

Diagnóstico: _____

Síntomas: Pre operatorios:

Grado de inconformidad con aspecto físico (puntaje 0-10):

TECNICA EMPLEADA: _____

ANESTESIA EMPLEADA: _____

Fecha de Egreso: _____

Síntomas Post operatorios: (24 Horas)

Sangrado: () 0=Ausente_____1=Ocasional_____ 2= Constante_____

Equimosis : () 0=Ausente_____1=Ocasional_____ 2= Constante_____

Hematoma: () 0=Ausente_____1=Ocasional_____ 2= Constante_____

Seroma: () 0=Ausente_____1=Ocasional_____ 2= Constante_____

Infección: () 0=Ausente_____1=Presente_____

Otra:_____

Primera semana:

Sangrado: () 0=Ausente_____1=Ocasional_____ 2= Constante_____

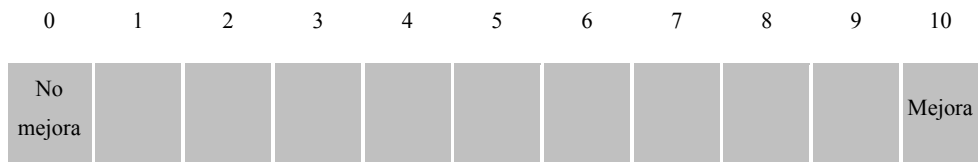
Equimosis : () 0=Ausente_____1=Ocasional_____ 2= Constante_____

Hematoma: () 0=Ausente_____1=Ocasional_____ 2= Constante_____

Seroma: () 0=Ausente_____1=Ocasional_____ 2= Constante_____

Infección: () 0=Ausente_____1=Presente_____

Resultados estéticos:



Grado de satisfacción:



Otra: _____

Cuarta semana:

Sangrado: () 0=Ausente_____1=Ocasional_____ 2= Constante_____

Equimosis : () 0=Ausente_____1=Ocasional_____ 2= Constante_____

Hematoma: () 0=Ausente_____1=Ocasional_____ 2= Constante_____

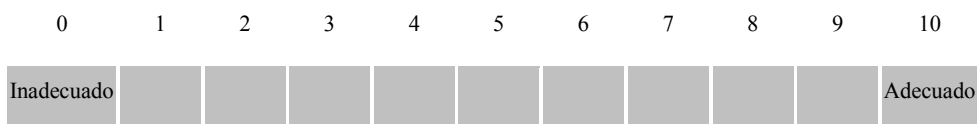
Seroma: () 0=Ausente_____1=Ocasional_____ 2= Constante_____

Infección: () 0=Ausente_____1=Presente_____

Resultados estéticos:



Grado de satisfacción:



Otra: _____

Octava semana:

Sangrado: () 0=Ausente_____1=Ocasional_____2= Constante_____

Equimosis : () 0=Ausente_____1=Ocasional_____2= Constante_____

Hematoma: () 0=Ausente_____1=Ocasional_____2= Constante_____

Seroma: () 0=Ausente_____1=Ocasional_____2= Constante_____

Infección: () 0=Ausente_____1=Presente_____

Resultados estéticos:



Grado de satisfacción:



Otra: _____

Sexto mes:

Sangrado: () 0=Ausente____ 1=Ocasional____ 2= Constante_____

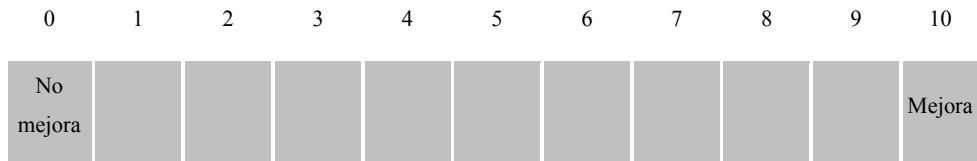
Equimosis : () 0=Ausente____ 1=Ocasional____ 2= Constante_____

Hematoma: () 0=Ausente____ 1=Ocasional____ 2= Constante_____

Seroma: () 0=Ausente____ 1=Ocasional____ 2= Constante_____

Infección: () 0=Ausente____ 1=Presente_____

Resultados estéticos:



Grado de satisfacción:



Otra: _____

