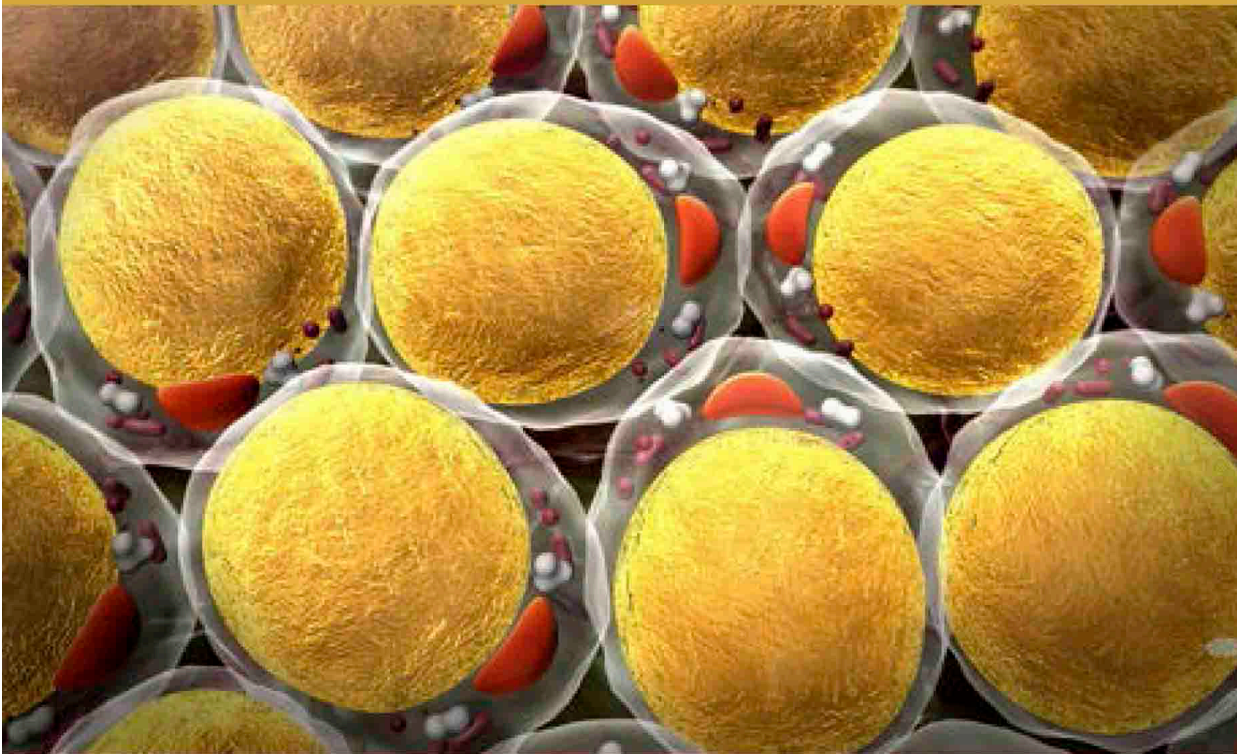




VNIVERSITAT D VALÈNCIA

Programa de doctorado 3139 (Medicina)

Optimización de las técnicas de criopreservación de tejido adiposo



TESIS DOCTORAL

Presentada por:
María Eloísa Villaverde Domenéch

Dirigida por:
Dra. Edurne Novella Maestre
Profa. Dra. Carmen Carda Batalla

Valencia, 2017



VNIVERSITATIS VALÈNCIA

Facultad de Medicina y Odontología
Departamento de Medicina
Programa de doctorado: 3139 Medicina

OPTIMIZACIÓN DE LAS TÉCNICAS DE CRIOPRESERVACIÓN DE TEJIDO ADIPOSO

Tesis Doctoral presentada por:
María Eloísa Villaverde Doménech

Dirigida por:
Dra. Edurne Novella Maestre
Profa. Dra. Carmen Carda Batalla

Valencia, 2016



Eduarne Novella Maestre, Doctora por la Universitat de València.

Carmen Carda Batalla, Catedrática del Departamento de Patología de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universitat de València.

CERTIFICAN:

Que la presente Tesis Doctoral, titulada "*Optimización de las técnicas de criopreservación de tejido adiposo*" ha sido realizada íntegramente por Dña. María Eloísa Villaverde Doménech bajo nuestra supervisión. Dicho trabajo está concluido y reúne todos los requisitos para su presentación y defensa como TESIS DOCTORAL ante un tribunal.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firmamos la presente certificación en Valencia, a 30 de noviembre de 2016.

Dra. Eduarne Novella Maestre

Profa. Dra. Carmen Carda Batalla

:: ÍNDICE DE CONTENIDOS

1	AGRADECIMIENTOS.....	13
2	ABREVIATURAS	19
3	RESUMEN.....	23
4	ABSTRACT	27
5	ESTADO ACTUAL DEL TEMA	33
5.1	MATERIALES DE RELLENO EN CIRUGÍA PLÁSTICA	33
5.2	TEJIDO ADIPOSO AUTÓLOGO COMO MATERIAL DE RELLENO. HISTORIA.....	36
5.3	RESULTADOS DEL INJERTO DE TEJIDO ADIPOSO. TASAS DE PRENDIMIENTO.....	45
5.4	ANATOMÍA E HISTOLOGÍA DEL TEJIDO ADIPOSO	51
5.5	CRIOPRESERVACIÓN DE TEJIDO ADIPOSO	55
5.5.1	Fisiología básica de la criopreservación	56
5.6	TIPOS DE AGENTES CRIOPROTECTORES	59
5.7	ASPECTOS LEGALES Y REGULACIÓN.....	63
6	JUSTIFICACIÓN	67
7	HIPÓTESIS	73
8	OBJETIVOS	77
8.1	OBJETIVO PRINCIPAL.....	77
8.2	OBJETIVOS SECUNDARIOS	77
9	MATERIAL Y MÉTODOS.....	81
9.1	MATERIAL Y MÉTODOS.....	81
9.2	SELECCIÓN DE PACIENTES, RECOGIDA DE MUESTRAS Y PROCESAMIENTO.....	82
9.2.1	Selección de pacientes.....	82
9.2.2	Recogida de muestras y procesamiento	84
9.3	DISEÑO EXPERIMENTAL. SELECCIÓN DE TEMPERATURA Y AGENTES CRIOPROTECTORES PARA LA CRIOPRESERVACIÓN DE TEJIDO ADIPOSO.	89

9.4	CRIOPRESERVACIÓN Y DESCONGELACIÓN DEL TEJIDO ADIPOSO.....	92
9.4.1	Congelación	92
9.4.2	Descongelación	92
9.5	MODELO ANIMAL. ESTUDIOS “IN VIVO”	93
9.6	ESTUDIOS HISTOPATOLÓGICOS	101
9.6.1	Fijación	101
9.6.2	Lavado	101
9.6.3	Aclaramiento o diafanización	102
9.6.4	Inclusión	102
9.6.5	Corte	103
9.6.6	Tinción y montaje	104
9.6.7	Observación y fotografía.....	105
9.7	ESTUDIOS MOLECULARES	105
9.7.1	Extracción de Ácido Ribonucleico mensajero	105
9.7.2	Análisis de la concentración del Ácido Ribonucleico...	106
9.7.3	Retrotranscripción	107
9.7.4	Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) estándar. Expresión génica de Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH).....	108
9.7.4.1	Componentes de la PCR	109
9.7.4.2	Proceso de la PCR	110
9.7.4.3	Normalización y controles endógenos	115
9.7.4.4	Identificación de los productos de PCR	118
9.7.5	PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR). Expresión génica de GAPDH y Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular (VEGF).....	121
9.8	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	129
10	RESULTADOS	133
10.1	CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES INCLUIDOS	133
10.2	ESTUDIO ESTRUCTURAL DEL TEJIDO ADIPOSO CRIOPRESERVADO CON TREHALOSA E HIDROXIETILSTARCH (HES) A DISTINTAS TEMPERATURAS DE CONGELACIÓN	135

10.3 ESTUDIO DE VIABILIDAD DEL TEJIDO ADIPOSO CRIOPRESERVADO CON TREHALOSA Y HES A DISTINTA TEMPERATURA DE CONGELACIÓN	142
10.4 ESTUDIOS DE TEJIDO ADIPOSO CRIOPRESERVADO EN EL MODELO ANIMAL	144
10.4.1 Estudio macroscópico de los implantes.....	144
10.4.2 Caracterización de los injertos. Tasa de prendimiento del injerto de tejido adiposo en modelo animal	145
10.5 ESTUDIO ESTRUCTURAL DEL TEJIDO ADIPOSO CRIOPRESERVADO E IMPLANTADO EN MODELO ANIMAL.....	149
10.6 ESTUDIO DE VIABILIDAD DEL TEJIDO ADIPOSO CRIOPRESERVADO E IMPLANTADO EN MODELO ANIMAL.....	154
10.7 ESTUDIO DE LA VASCULARIZACIÓN DEL TEJIDO ADIPOSO CRIOPRESERVADO E IMPLANTADO EN MODELO ANIMAL.....	157
11 DESARROLLO ARGUMENTAL	163
12 CONCLUSIONES	177
13 BIBLIOGRAFÍA	181
14 ANEXO	191
13.1 PREMIO RESIDENTES SECPRE- ACCÉSIT	191
13.2 AUTORIZACIÓN COMITÉ ÉTICO	193
13.3 PERMISO COMITÉ BIENESTAR ANIMAL	199
13.4 CONGRESOS.....	201

:: AGRADECIMIENTOS

1 AGRADECIMIENTOS

Es cierto que la elaboración de esta tesis doctoral ha supuesto un gran esfuerzo para mí, sin embargo, la gratificación que siento al ver el resultado de estos años de trabajo es incomparable. Mucha gente viene a mi cabeza cuando hago memoria de cómo se ha realizado esta tesis: hace ya algunos años que me embarqué en la realización de este loco proyecto (o al menos eso parecía al principio), que poco a poco se fue materializando con ayuda y apoyo de muchas personas... Cada granito de arena ha contado, aunque si he de destacar a las personas que más han participado y gracias a las cual hoy me encuentro redactando por fin el apartado de los agradecimientos de mi tesis, querría en primer lugar dar las gracias a la Dra. Edurne Novella Maestre, directora de mi tesis, quien ha estado ahí de principio a fin, colaborando y guiándome en todas las fases del proyecto. Gracias incansable Edurne, por tu gran trabajo, por tu perfeccionismo, por empaparme con tu sabiduría y tu buen hacer, por saber frenar mis brotes de impaciencia y también las inseguridades, gracias por tu apoyo incondicional y en definitiva, porque esta tesis llegue a buen puerto. El tiempo que hemos pasado juntas, trabajando y sin trabajar ha sido excepcional, guardo muy buen recuerdo de estos años que nos han unido.

Gracias también a la Dra. Carmen Carda Batalla, co-directora de la tesis, que ha colaborado de modo muy destacable con el análisis histológico de las muestras, y con sus productivas y rigurosas revisiones de la tesis doctoral, que han contribuido a mejorar el nivel de este trabajo.

Gracias al Dr. Roberto Moltó García, por fomentar e incitar mi espíritu investigador, darme ideas para proyectos y apoyarme en los proyectos que íbamos llevando a cabo, poniendo todos los medios necesarios a mi disposición. Has sido crucial tanto para la consecución de la tesis, como para facetas más prácticas dentro del aprendizaje de nuestra especialidad. Gracias por mostrarme confianza desde siempre, porque ha servido para reafirmarme en mi labor.

Gracias a Eva Blanch Torres, la veterinaria del animalario de la Facultad de Medicina de Valencia que tanta ayuda nos ofreció desinteresadamente mientras realizamos la experimentación animal, tanto a mí como a la Dra. Virina González Alonso. La Dra. Virina González además de gran colaboradora en este trabajo, en especial en las fases de experimentación, es una gran compañera y gracias a ella aprendí lo que es trabajar en equipo, dentro de nuestro pequeño grupo investigador, que tantas alegrías nos ha dado. Recuerdo también el trabajo de esas tardes de revisar y analizar datos, artículos, tardes que además de

productivas (luego veríamos el fruto), fueron entrañables y divertidas.

Gracias a mis compañeros, tanto adjuntos como residentes, del Servicio de Cirugía Plástica del Hospital Universitari La Fe (Valencia), que tanto apoyo y respeto me han mostrado cuando me aventuraba en los oscuros mundos de la investigación (o al menos es como se observa en ocasiones al otro lado del bisturí).

Gracias a mis padres Antonio Villaverde y Emilia Doménech, y mi hermana Rebeca, que me han hecho como soy, con mis defectos y mis virtudes, pero sobre todo libre y consciente de lo que de verdad importa en la vida; gracias por inculcarme el gran valor de la familia y esforzaros por llevarlo a cabo.

Gracias a Miguel, por su apoyo incondicional, sobra decir que me ha aguantado estoicamente mientras realizaba este proyecto, gracias por darme tu visión de la vida, por ponerme los pies en la tierra, por regalarme tu sonrisa día y a día, por tu dulzura y por mantener mi ilusión ayer, hoy y mañana, ¡qué buen compañero de viaje me acompaña!

:: ABREVIATURAS

2 ABREVIATURAS

- ADNc: Ácido desoxirribonucleico circular
- ARN: Ácido ribonucleico
- ARNm: Ácido ribonucleico mensajero
- ADSCs: Células madre derivadas de tejido adiposo (Adipose-derived stem cells)
- ACP: Agente crioprotector (Cryoprotector Agent)
- DE: Desviación estándar
- DMEM: Dulbecco's Modified Egel Medium
- DMSO: Dimetilsulfoxido
- FCR: Fuerza Centrífuga Relativa
- FDA: Food and Drug Administration
- GAPDH: Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
- HES: Hidroxietilstarch
- IMC: Índice de masa corporal
- PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction).
- PVP: Polivinil Piridina
- RT-qPCR: PCR cuantitativa a tiempo real (Real-Time quantitative PCR)
- SEM: Error estándar de la media
- TA: Tejido Adiposo
- T^a: Temperatura
- UE: Unión Europea
- VEGF: Factor de crecimiento del endotelio vascular (Vascular endothelial growth factor)

:: RESUMEN

3 RESUMEN

Objetivos

Uno de los progresos más notables en cirugía plástica en los últimos años ha sido la utilización y perfeccionamiento de las técnicas para el manejo del tejido adiposo (TA). Uno de los principales problemas de los injertos de TA es la tasa de reabsorción, que implica procedimientos repetidos de lipoaspiración y lipoinyección, aumentando los costes y complicaciones quirúrgicas, así como el dolor y discomfort para el paciente. Esta es la razón por la que la criopreservación de TA sería extremadamente útil. El objetivo de este estudio es desarrollar un protocolo de criopreservación de TA que simplifique de manera significativa los protocolos desarrollados hasta el momento, sin disminuir la funcionalidad y la viabilidad del TA después de la descongelación y el trasplante.

Material y Métodos

Se compararon dos temperaturas (T^a) de congelación (-20° y -80°) y dos agentes crioprotectores (ACPs): trehalosa e hidroxietilstrach (HES), mediante un protocolo de congelación lenta. Para ello, el TA de 4 pacientes fue extraído y procesado mediante la técnica de Coleman. A continuación el TA fue dividido en 5 grupos experimentales y procesado de la siguiente forma:

- Grupo Control: TA fresco.
- Grupo 1: T^a -20°C (medio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)/F2, 10%HES).
- Grupo 2: T^a -80°C (medio DMEM/F2, 10%HES).
- Grupo 3: T^a -20°C (medio DMEM/F2, 0.35M trehalosa).
- Grupo 4: T^a -80°C (medio DMEM/F2, 0.35M trehalosa).

Tras 1 semana las muestras fueron descongeladas mediante inmersión en baño a 40°C y procesadas para evaluar la morfología (estudios histológicos) y viabilidad tisular (estudios moleculares: la expresión génica de Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH)).

A partir de los resultados obtenidos se procedió a la realización del estudio "in vivo" eligiendo como T^a de criopreservación -20°C. Injertos de TA procedente de 6 pacientes y extraídos siguiendo el mismo procedimiento que en el estudio previo fueron trasplantados en ratones inmunodeficientes (n=15). Las muestras de cada paciente fueron divididas en 5 grupos experimentales y a continuación pesadas y procesadas de la siguiente forma:

- Grupo Control: TA fresco.
- Grupo A: T^a -20°C (medio DMEM/F2, 10% de HES), TA criopreservado 1 mes.

- Grupo B: T^a -20°C (medio DMEM/F2, 10% de HES), TA criopreservado 2 meses.
- Grupo C: T^a -20°C (medio DMEM/F2, 0.35 trehalosa), TA criopreservado 1 mes.
- Grupo D: T^a -20°C (medio DMEM/F2, 0.35 trehalosa), TA criopreservado 2 meses.

Tras 1 mes post-inoculación los animales fueron sacrificados procediéndose a la recuperación de las muestras las cuales fueron pesadas y procesadas para su estudio histológico, estudio de viabilidad (expresión de GAPDH) y estudio de vascularización (expresión génica de Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular o VEGF).

Resultados

El estudio histológico inicial, demostró que las muestras de TA de los grupos criopreservados (Grupos 1-4) mostraban unas características histológicas normales y similares a las del grupo control (fresco). Se observó expresión de GAPDH en todos los grupos experimentales (Control: $4,72 \pm 0,13$; Grupo 1: $7,02 \pm 2,33$; Grupo 2: $9,02 \pm 2,70$; Grupo 3: $4,64 \pm 0,91$; Grupo 4: $6,31 \pm 0,65$). No se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) cuando se compararon los grupos criopreservados entre ellos o con el grupo control.

En cuanto a los estudios “in vivo”, los grupos criopreservados (A-D) presentaron un buen prendimiento y conservación de la

arquitectura típica del TA en comparación con el grupo control (fresco), así como una evidente red vascular indicativa de un proceso de neovascularización. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p>0,05$) en cuanto a la tasa de prendimiento (%) (Grupo Control $33,77\pm 9,63$; A: $18,88\pm 5,41$; B: $32,17\pm 14,19$; C: $22,10\pm 9,83$; D: $26,09\pm 15,40$) expresión génica de GAPDH (Grupo Control: $6,81\pm 0,63$; A: $6,74\pm 0,43$; B: $6,54\pm 0,84$; C: $6,17\pm 0,17$; D: $7,26\pm 0,62$) o expresión génica de VEGF (Grupo Control: $16,17\pm 1,72$; A: $14,93\pm 1,94$; B: $14,27\pm 2,52$; C: $15,49\pm 1,61$; D: $16,61\pm 1,63$) cuando se compararon los grupos criopreservados entre ellos o con el grupo control.

Conclusiones

La congelación lenta de TA a -20°C con trehalosa o con HES supone un procedimiento de criopreservación de TA sencillo y simple con resultados similares al TA fresco en términos de viabilidad tisular y características morfo-histológicas. La utilización de estos dos ACPs de baja toxicidad constituyen un protocolo sencillo aplicable a la práctica clínica habitual. El tiempo de criopreservación de las muestras no influye en la adecuada conservación del TA.

4 ABSTRACT

Objectives

One of the most outstanding improvements in plastic and reconstructive surgery over the last years has been the utilization of adipose tissue (AT) in reconstructive surgery, and the improvement of processing techniques.

One of the main problems of AT grafts is the fat absorption rate that implies repeated procedures including both lipoaspiration and lipoinjection to achieve the desired result. The mentioned procedures increase the cost and surgical risks, as well as exposing the patient to pain and discomfort.

This is the reason why cryopreservation of AT would be an interesting tool in this field. The aim of this study is to develop an AT cryopreservation protocol that simplifies the developed protocols up to this time, without decreasing the functionality and viability of AT after thawing and transplantation.

Methods

Two cryopreservation temperatures (T°): -20°C and -80°C , and two cryoprotector agents (ACPs): trehalose and hydroxietilstarch (HES), by a slow-freezing protocol, were compared. For this purpose, AT from 4 patients was harvested and processed following the technique described by Coleman. Next, AT was divided in 5 experimental groups and processed as it follows:

- Control group: fresh AT.
- Group 1: T° -20°C (DMEM/F2 medium, 10%HES).
- Group 2: T° -80°C (DMEM/F2 medium, 10%HES).
- Group 3: T° -20°C (DMEM/F2 medium, 0.35M trehalose).
- Group 4: T° -80°C (DMEM/F2 medium, 0.35M trehalose).

Samples were thawed after 1 week, by their immersion in 40°C baths, and were processed to evaluate the morphology (histological studies) and tisular viability (molecular studies: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) genic expression).

Based on the obtained results, an “in vivo” study was performed, choosing as cryopreservation T° -20°C. AT grafts from 6 patients were harvested following the same procedure as in the previous study were transplanted into immunodeficient mice (n=15). Samples of each patient were divided in 5 experimental groups and next they were weighted and processed as it follows:

- Control group: fresh AT.
- Group A: T° -20°C (DMEM/F2 medium, 10% HES), 1-month cryopreserved AT.
- Group B: T° -20°C (DMEM/F2 medium, 10% HES), 2-month cryopreserved AT.

- Group C: T° -20°C (DMEM/F2 medium, 0.35 trehalose), 1-month cryopreserved AT.
- Group D: T° -20°C (DMEM/F2 medium, 0.35 trehalose), 2-month cryopreserved AT.

After 1 month of inoculation, animals were slaughtered and samples were recovered, samples that were weighted and processed for histological study, viability study (GAPDH genic expression) and vascularization study (Vascular Endothelial Growth Factor or VEGF genic expression).

Results

The initial histologic study, demonstrated that all AT cryopreserved groups samples (Groups 1 to 4) showed typical histologic features of AT and they were similar to control group (fresh). GAPDH expression was observed in all experimental groups (Control: 4.72 ± 0.13 ; Group 1: 7.02 ± 2.33 ; Group 2: 9.02 ± 2.70 ; Group 3: 4.64 ± 0.91 ; Group 4: 6.31 ± 0.65). Statistically significant differences were not observed (>0.05) when cryopreserved groups were compared with themselves and with the control group.

Related to the “in vivo” studies, cryopreserved groups (A-D) showed good take of the graft and normal AT architectural preservation, compared to control group (fresh tissue), as well as a clear vascular network, indicative of the neovascularisation process. Statistically significant differences were not found ($p > 0.05$) with regard to graft take

(%) (Control Group 33.77 ± 9.63 ; A: 18.88 ± 5.41 ; B: 32.17 ± 14.19 ; C: 22.10 ± 9.83 ; D: 26.09 ± 15.40), GAPDH genic expression (Control Group: 6.81 ± 0.63 ; A: 6.74 ± 0.43 ; B: 6.54 ± 0.84 ; C: 6.17 ± 0.17 ; D: 7.26 ± 0.62) or VEGF genic expression (Control Group: 16.17 ± 1.72 ; A: 14.93 ± 1.94 ; B: 14.27 ± 2.52 ; C: 15.49 ± 1.61 ; D: 16.61 ± 1.63) when cryopreserved groups are compared with themselves or with the control group.

Conclusions

Slow freezing at -20°C using trehalose or HES as ACPs is a straightforward and easy AT cryopreservation procedure with similar results to fresh AT in terms of tisular viability and morpho-histological characteristics. The utilization of these two low toxicity ACPs constitute a simple procedure that is feasible in common clinical practice. Cryopreservation time does not affect the proper AT maintenance.

:: INTRODUCCIÓN

5 ESTADO ACTUAL DEL TEMA

5.1 Materiales de relleno en Cirugía Plástica

Dentro de la especialidad de Cirugía Plástica, una de las patologías clave son las deformidades corporales. Uno de los objetivos básicos dentro de esta amplia especialidad ha sido corregir estas deformidades, y una de las herramientas más comúnmente utilizadas para este fin son los materiales de relleno.

Existen una infinidad de materiales de relleno (sintéticos, biológicos, autólogos), pero aún no se ha llegado a determinar cuál es el material de relleno ideal; ni siquiera hay consenso en qué propiedades ha de tener éste. Sin embargo, hay ciertos puntos acerca de las propiedades del relleno ideal, en los que coinciden los diferentes autores (1):

1. Deben ser biocompatibles, integrándose en los tejidos del huésped, sin degeneración ni alteración del material de relleno, ni tampoco del organismo receptor.
2. Del mismo modo, no han de ser tóxicos, ni han de ser teratogénicos ni cancerígenos, para evitar efectos deletéreos dentro del organismo huésped.
3. Inmunológicamente inertes, tanto para evitar el rechazo por el sistema inmunológico, como para

- evitar la exacerbación de enfermedades autoinmunes o con claro componente inmunogénico (lupus, artritis reumatoide).
4. Una máxima a seguir ha de ser la reposición mediante materiales semejantes, es decir, reponer un tejido con otro de características similares.
 5. Permanentes, con resultados perdurables en el tiempo.
 6. Fácilmente removibles, permitiendo tanto correcciones tras su inyección, como la retirada del producto ante la petición del paciente por motivos estéticos o ante la necesidad terapéutica, como por ejemplo en procesos oncológicos.
 7. Como prioridad, el material no debe influir o distorsionar los métodos diagnósticos y de detección de procesos patológicos, incluyendo tanto la exploración física como las pruebas radiológicas de las que podamos tener necesidad.
 8. Baratos en la medida de lo posible, o disponibles en cantidades suficientes, fácilmente adquiribles, y en repetidas ocasiones.
 9. Preferentemente autólogos.

Desde la década de los 50 hasta 1990, en Estados Unidos estaba muy extendido el uso de silicona como material de relleno para pequeños déficits de tejido, pero su alta tasa de complicaciones (formación de nódulos o durezas, extrusión, migración, infiltración de tejidos, eritema, queloides,

infecciones, fístulas, necrosis cutánea, reacción a cuerpo extraño, etc.) hizo que se prohibiera su uso. La silicona no es un material biocompatible y no es reabsorbible por el organismo. Hoy en día sólo existen 2 geles de silicona aprobados por la Food and Drug Administration (FDA), AdatoSil 5000™ y Silikon 1000™, destinados al tratamiento del desprendimiento de retina; no están indicados para tratamientos estéticos ni como rellenos. Otros rellenos no reabsorbibles son la parafina y los biopolímeros.

Posteriormente, en 1981 apareció el colágeno bovino, se usaba para aumentos de mayor tamaño que los casos en los que se utilizaba silicona. Se convirtió en el “gold standard” de los materiales de relleno; se trata de un material reabsorbible cuyo principal problema es la incidencia de reacciones alérgicas.

Dos décadas después apareció el ácido hialurónico, que sustituyó al colágeno bovino como relleno de tejidos blandos, con una menor tasa de reacciones de hipersensibilidad y una duración aproximada de 1 año hasta su reabsorción. Uno de sus principales inconvenientes es el alto precio de este producto (1).

En general los rellenos de tejido blando inyectables, pese a su uso extendido, presentan a menudo complicaciones en los tejidos huésped: tanto reacciones inmunogénicas con reacción a cuerpo extraño, que producen granulomas y

fibrosis, así como reacciones alérgicas, rechazo, problemas de extrusión, etc. (2,3), además de suponer un coste importante.

5.2 Tejido Adiposo (TA) autólogo como material de relleno. Historia

A lo largo de la historia de nuestra especialidad, múltiples materiales de relleno se han utilizado, siendo los de tipo autólogo, los que más se acercan a la definición de material de relleno ideal.

El TA del propio paciente (2), se aproxima mejor y cumple la mayoría de características del relleno ideal. El empleo de este tejido no supone nada nuevo, ya que su uso está documentado desde finales del siglo XIX, y es sobre todo en el transcurso del siglo XX, cuando se desarrollaron diferentes técnicas que permitieron transferir células adiposas del propio paciente de una parte del cuerpo a otra más distante, obteniendo resultados aceptables (3).

Ya en 1893 Gustav Neuber (4) publicó por primera vez el uso de injerto de TA que aparece en la literatura, utilizando como zona donante la parte posterior del brazo para rellenar defectos faciales cicatriciales. Dos años después, en 1895, Cnerzy y cols. realizaron el primer injerto de TA en mama, a

partir de un lipoma, para simetrizar las mamas tras una tumorectomía (5).

En 1911 Bruning introdujo el uso de la jeringa para inyectar grasa, lo aplicaba a deformidades post-rinoplastia, utilizando una aguja para depositar el injerto de TA (6). Su contemporáneo Eugene Holländer (Berlín, 1867-1932), también empezó a utilizar el TA como un material de relleno inyectable, tras el procesamiento y mezcla de TA humano y de carnero. Publicó en 1910 y 1912 una serie de casos de pacientes con lipoatrofia en los cuales infiltró injertos adiposos en la cara con muy buenos resultados (7,8) y también infiltró TA en secuelas mamarias post-mastectomía (suya es la primera publicación acerca de este procedimiento) (Figura 1A-B).

La cirugía plástica ha experimentado gran desarrollo en los períodos de conflictos bélicos. Es así como se empieza a descubrir el gran potencial regenerativo del TA, así como sus propiedades de cicatrización, cuando los cirujanos que se encargaban de reconstruir las mutilaciones y desfiguramientos de los soldados participantes en la Primera Guerra Mundial, empezaron a aplicar injertos de TA. En este contexto, y tras adquirir una gran experiencia, en 1919 Erixh Lexer (1867-1937) publica “Die Freien Transplantation” un libro de dos tomos acerca los diferentes injertos tisulares (cartílago, grasa...) (Figura 1C-D) en el cual dedica casi 300 páginas a los injertos de grasa, que eran disecados en

bloque junto a dermis (injerto dermograso), y publicó múltiples aplicaciones en distintas áreas corporales, para reconstrucción de defectos de contorno, deformidades postraumáticas, anomalías congénitas (Figura 1E-F), y otras aplicaciones como aliviar rigideces postraumáticas, mejorar deslizamiento del aparato tendinoso y disminuir la sintomatología de la enfermedad de Dupuytren (9,10).

En 1926 Charles Conrad Miller empezó ya a utilizar cánulas para realizar la infiltración, y publicó una serie de 36 pacientes a los que realizó una corrección de secuelas cicatriciales de cabeza y cuello, con buenos resultados, aunque el impacto en la época no fue considerable, siendo el uso de los injertos de TA abandonado en los años siguientes (11).

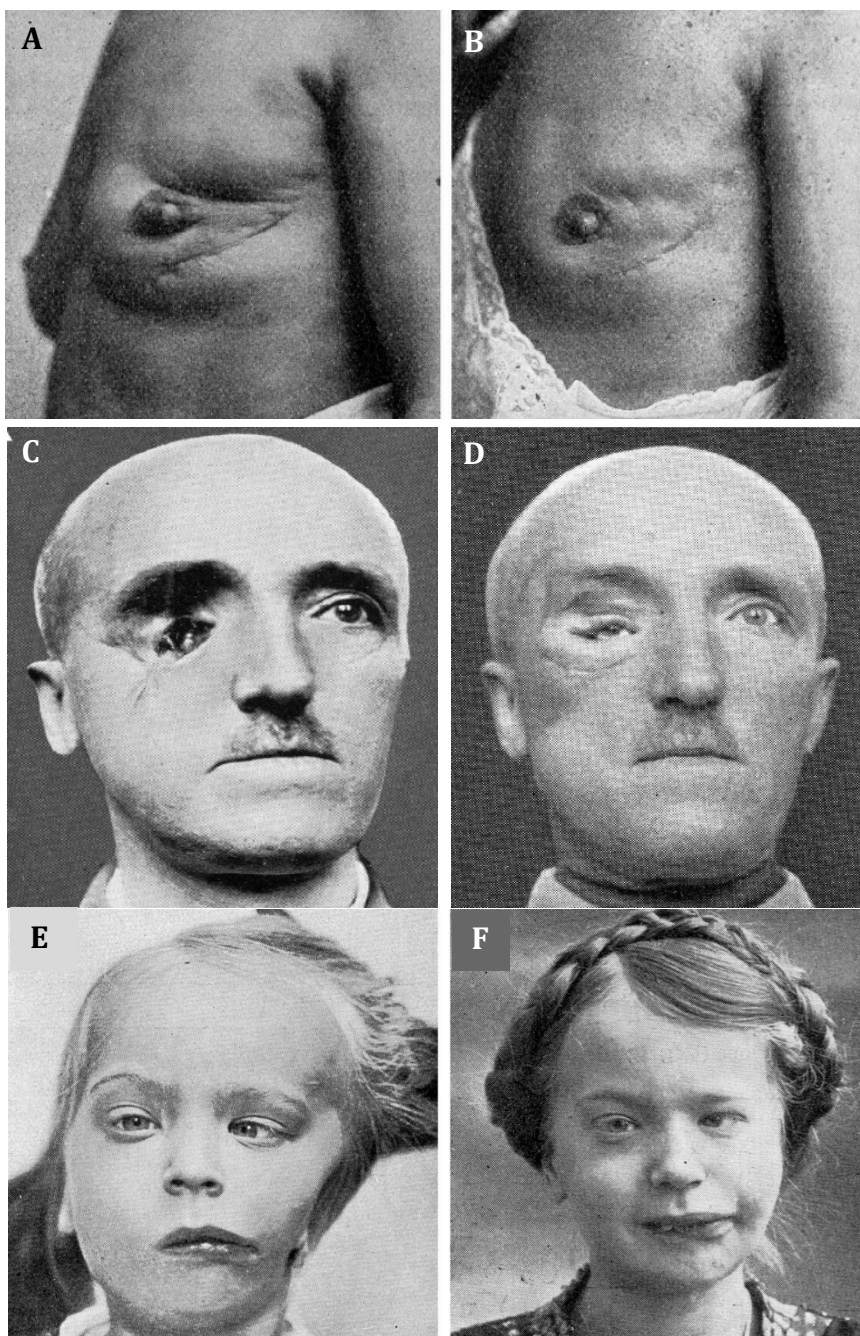


Figura 1.- Injertos de TA en pacientes. Apariencia. pre-operatoria (A) y post-operatoria (B) de cicatrices por mastectomía tratadas con injerto de TA (Tomado de De Hollander y cols., 1910) (7). Imagen pre-operatoria (C) y post-operatoria (D) de lesiones en cavidad orbitaria reconstruida con injertos de piel, cartílago y TA, para conformar un lecho adecuado donde alojar una prótesis ocular (Tomado de De Lexer E. y cols. 1924) (9). Tratamiento de microsomía hemifacial mediante injertos de TA (E, F) (Tomado de De Lexer E. y cols. 1924) (9).

En la década de los años 50, Peer y cols. (12) estudiaron la supervivencia de los injertos de TA, y formulando varias teorías acerca del mecanismo por el cual se mantienen los injertos de grasa. Según Peer y cols. el mantenimiento de volumen de TA es dependiente del número inicial de adipocitos en el momento del trasplante; la pérdida de injerto adiposo es de alrededor de un 50% del volumen inicial, y depende en gran medida de que la vascularización en el lecho receptor sea la adecuada. La pérdida de volumen en el injerto de TA va acompañada de formación de quistes oleosos y zonas de fibrosis.

En la década de los 70, se desarrolló la técnica de liposucción, que supone un hito histórico importante de cara a lo que iba a suceder en los siguientes años. Ligado a esta técnica volvió a resurgir el uso de los injertos de TA, cuando Illouz y cols. popularizaron el uso de los lipoinjertos para corregir deformidades: el TA se obtenía de las liposucciones y se injertaba fácilmente en el lugar deseado, en especial en defectos de contorno y en secuelas de las propias liposucciones (13).

A partir de entonces, la técnica fue ganando adeptos, y diversos cirujanos empezaron a aplicar los injertos de TA a múltiples defectos de contorno, con diferentes protocolos y procesamientos, con resultados heterogéneos y tasas de prendimiento variables.

Es en este contexto en el que Sidney Coleman (Universidad de Nueva York), en los años 90, formalizó y sistematizó los pasos para la extracción y procesamiento del TA, así como su inyección, desarrollando una técnica propia para el tratamiento de los injertos de TA, acuñando el término de lipoestructura o “Structural Fat Grafting”. Esta técnica se basa en injertar la grasa en múltiples pases, en diferentes planos y depositando en cada uno de ellos pequeñas cantidades de TA (14-16). Este es un método protocolizado y perfeccionado que sintetiza las técnicas desarrolladas a lo largo de todo el siglo XX, protocolo que Coleman empezó a desarrollar en los años 90 y que tuvo una difusión mundial durante la primera década del siglo XXI, con numerosas publicaciones, y que ha supuesto un avance revolucionario y el impulso definitivo para que los injertos de TA se hayan convertido en una de las herramientas básicas para el cirujano plástico, con infinidad de aplicaciones en todas las áreas corporales, y mediante la utilización de herramientas de un bajo coste. Coleman defiende en sus trabajos que su método presenta tasas de viabilidad y prendimiento de los injertos de grasa superiores a los que presentan otros procedimientos (decantación, filtración, etc.) (14,15,17).

Tras el gran éxito y popularización de la técnica de Coleman, los estudios acerca del TA han crecido de una forma exponencial, abarcando desde los métodos de procesamiento, la viabilidad, las subpoblaciones celulares que existen dentro de los injertos de TA (entre ellas las

Células madre derivadas del TA, o como se las conoce en inglés “Adipose-derived stem cells” o “ADSCs”), las propiedades regenerativas del TA, etc. (18,19).

Uno de los más importantes fue el realizado en 2001 por Zuk y cols. (19), en el cual analizan las poblaciones celulares dentro del TA, y demostraron, no sólo que este tejido es rico en células madre mesenquimales derivadas del TA, sino que es la fuente más grande de este tipo de células, dentro del organismo, incluso más rico que la médula ósea. Éstas son conocidas como ADSCs, y cumplen varias funciones: se pueden dividir en nuevas células madre, manteniendo la reserva de esta línea celular con potencial regenerativo, así como diferenciarse a otros tipos de tejido (hueso, músculo, cartílago, TA, etc.).

Se cree que las células madres presentes en el TA son las responsables del potencial regenerativo y los beneficios en los procesos de curación que se observan tras realizar un injerto de TA, lo cual estaría relacionado con su capacidad de diferenciación a otras líneas celulares (15,20).

En 2007 Rigotti y cols. publicaron un estudio revolucionario en el que demuestran que la aplicación de ADSCs es beneficioso para la restitución y regeneración de los tejidos mamarios dañados tras la radioterapia (18). En su estudio, realizaron el procesamiento del TA concentrando las ADSCs, y lo distribuyen sistemáticamente en el tejido dañado por

radioterapia con ayuda de un sistema informático. Se incluyeron los casos de daños por radioterapia más severos, los grados 3 y 4 según la escala LENT-SOMA. En todos los pacientes se observó una mejora o remisión completa de las lesiones radiodermíticas, y los análisis histológicos mostraron regeneración de los tejidos, con aparición de patrones de microvascularización normales, establecimiento de una arquitectura adecuada en el tejido neoformado, con células adiposas maduras y otras líneas celulares. Por lo tanto la mejora registrada fue tanto a nivel clínico como estructural.

Los trabajos de Rigotti supusieron un gran impulso a los estudios en medicina regenerativa a partir de TA. En muchos centros se ha comenzado a diseñar protocolos y métodos para enriquecer los injertos de TA con ADSCs (21) y con fracción estromal vascular (Stromal Vascular Fraction o SVF) (22,23) debido a sus propiedades regenerativas y la mejora de la tasa de prendimiento, como ya hemos comentado, y como han demostrado otros estudios experimentales y clínicos (17).

Un contenido rico en ADSCs favorecería el prendimiento del TA, la angiogénesis y la diferenciación a otras líneas celulares (células endoteliales, adipocitos, condrocitos), efectos mediados a través de la liberación por las ADSCs de factores angiogénicos (24), factores de crecimiento y factores de diferenciación. Las ADSCs además de promotoras de diferenciación por la síntesis de estos factores, también

funcionarían como andamio o esqueleto tisular, en el que las nuevas células se organizarían para formar nuevas estructuras.

Hoy en día, el gran avance que han supuesto los injertos de TA, y las múltiples aplicaciones con resultados satisfactorios, tanto en el campo de la cirugía reconstructiva, como en la estética y en la medicina regenerativa, han colocado a este procedimiento entre los más populares y utilizados dentro de nuestra especialidad. Entre su infinidad de aplicaciones se encuentran la reconstrucción de defectos mamarios tras cirugía oncológica, tanto de modo inmediato (25) como diferido, la utilización como complemento de colgajos pediculados y libres, la remodelación facial en pacientes con lipoatrofia facial (26,27), síndrome de Parry Romberg, síndrome de Goldenhar, síndrome de Treacher Collins, y otras dismorfias faciales que cursen con atrofia facial, en lesiones cutáneas tras radioterapia, y en general como relleno para corregir deformidades corporales, retracciones, secuelas de quemaduras, etc. Otras aplicaciones menos comunes son en Enfermedad de Dupuytren y en incompetencia velofaríngea (15). Por todo ello, el tejido adiposo se ha convertido en un campo de investigación prometedor, del que ya conocemos muchos aspectos, pero del que aún nos queda otro tanto o más por descubrir.

5.3 Resultados del injerto de TA. Tasas de prendimiento

La tasa de prendimiento del injerto de TA, es muy variable. Incluso en los cirujanos más experimentados, se habla de tasas que van desde 50% al 90% (17) aunque se observa mucha heterogeneidad entre los diferentes autores e incluso entre los pacientes de un mismo cirujano. En otras series se reporta una tasa de reabsorción de hasta el 60-70%, llegando incluso al 85% en algunas publicaciones (3,23,28). Sin embargo, en muy pocos estudios se presenta un método objetivo y validado para determinar con exactitud el prendimiento del TA, ello es debido a la dificultad de realizar estudios histológicos de prendimiento en la práctica clínica, por precisar métodos invasivos. Es por ello que la mayoría de mediciones son indirectas, con alto grado de inexactitud. Fontdevila y Cols. (2008) realizaron un estudio con mediciones objetivas para evaluar la evolución y viabilidad a largo plazo del tejido adiposo, en pacientes VIH que se trataron utilizando lipoinjertos (29), mediante análisis seriado del volumen a través de pruebas de imagen. Demostraron que el volumen de grasa puede ser determinado y registrado a lo largo del tiempo, gracias al estudio con tomografía computerizada, y que los lipoinjertos no sólo mantenían su viabilidad y volumen más allá de 12 meses, sino que su volumen aumentaba. Sin embargo, hablan de volúmenes y no de tasa de prendimiento) (29).

En general hablar de prendimiento y usar la exploración clínica para evaluarlo, es poco preciso. Además, al realizar un lipoinjerto se produce un aumento del volumen inicial que se debe en parte al propio edema de la técnica realizada, no exclusivamente a las células lipoinjertadas, y por otra parte, si medimos el volumen de un área lipoinjertada meses después del procedimiento, en ese área se habrán producido cambios tisulares, atrofia celular, envejecimiento, etc. por lo que no se puede asegurar que la disminución de volumen en esa zona se deba exclusivamente a la reabsorción del injerto de tejido adiposo.

La mayoría de autores defienden que el injerto se infiltre mediante pequeños volúmenes, para obtener tasas de prendimiento más altas. En 2011 Eto y cols. publicaron un interesante estudio (28) en el que tras realizar experimentos de viabilidad del TA “in vitro” e “in vivo”, nos presenta su modelo zonal de supervivencia del TA.

De acuerdo a su modelo, en cada uno de los lóbulos que infiltramos al hacer los injertos de TA, podemos distinguir tres zonas con diferentes características y viabilidad:

- Zona periférica o de supervivencia. Esta zona, que mide 100-300 micras de espesor, situada en la periferia del lóbulo adiposo, es la zona donde sobreviven tanto los adipocitos maduros como las

ADSCs. Es la zona inmediatamente en contacto con el lecho receptor y que se vasculariza rápidamente.

- Zona intermedia o regenerativa, se sitúa en profundidad, de 300 a 1200 micras. En ella los adipocitos mueren desde el día 1 y las ADSCs (más resistentes a la isquemia) sobreviven, y posteriormente darán lugar a nuevos adipocitos maduros.
- Zona profunda, central o de necrosis. Situada a más de 1200 micras de profundidad desde la periferia del lóbulo. En esta zona la isquemia es tal que tanto los adipocitos como las ADSCs mueren, posteriormente esta zona se reabsorbe o se fibrosa, disminuyendo el tamaño total del implante.

Este modelo muestra que los injertos de TA no se comportan como entes estáticos sino que en su seno se producen muchos cambios y las células tienen capacidad de diferenciarse y estructurarse de un modo estable si las condiciones del receptor son las adecuadas. Por otro lado también apoya la idea de que cuánto menor sea el tamaño de los lóbulos adiposos injertados, mayor será la tasa de prendimiento, porque menor será el tamaño de la zona de necrosis (la zona central de cada lóbulo, donde es más difícil que lleguen los nutrientes) (28).

La viabilidad celular del TA además va a estar afectada por otras múltiples variables: la zona donante del TA, las

comorbilidades del paciente, los métodos de recogida de muestras, el uso o no de lidocaína (30) el procesamiento (decantación, filtración, centrifugación...), las características de la cánula e instrumental utilizado, el método de lipoinyección, etc.

El efecto de la adrenalina y la lidocaína sobre las células adiposas ha sido estudiado en múltiples ocasiones, y mientras que la adrenalina parece ser inocua para las células, la lidocaína sí parece tener efectos perjudiciales: inhibe el transporte de glucosa, la lipólisis y el crecimiento en los cultivos mientras está presente, de modo que tras lavar las células, éstas recuperan su función (30). Por otro lado, la presencia de hematíes en los injertos de TA también tendría efectos deletéreos, al incrementar la respuesta inflamatoria y la degradación de los adipocitos.

Aún hay muchos otros aspectos que influyen en el prendimiento de los injertos de TA que desconocemos. La falta de predictibilidad y variabilidad en la tasa de reabsorción conducen a que muy frecuentemente sean necesarios procedimientos adicionales para conseguir unos resultados óptimos en el proceso reconstructivo. El TA se ha afianzado en los últimos años como un biomaterial de relleno ideal para el uso clínico, con infinidad de aplicaciones, aunque aún quedan ciertos detalles técnicos que se han de perfeccionar: simplificar las técnicas de extracción, optimizar la cantidad extraída, mejorar las técnicas de procesamiento, minimizar

las pérdidas y conseguir maximizar las tasas de prendimiento.

Por el momento, lo habitual es que sea necesario repetir este tipo de procedimiento para conseguir el resultado deseado, por lo que generalmente se informa al paciente de ello, explicando en la visita preoperatoria que serán precisas varias sesiones de injerto autólogo de grasa para obtener el resultado óptimo (2,3,17).

La utilización de injertos de TA comprende dos fases: 1) la lipoaspiración (extracción de la grasa mediante cánulas), con el procesamiento de las muestras y 2) la lipoinfiltración del injerto adiposo propiamente.

El procedimiento de lipoaspiración es el que más molestias y efectos no deseados causa al paciente. Si sólo utilizamos anestesia local para su extracción puede producir molestias durante el proceso de extracción; por el contrario, si realizamos el procedimiento con anestesia general, supone un procedimiento más invasivo, con mayores costes, necesidad de quirófano y en general mayor utilización de recursos hospitalarios. Además, por lo general, el proceso de lipoaspiración tiene como efectos secundarios en el paciente dolor postoperatorio, edema, hinchazón de la zona donante, así como otros efectos menos frecuentes entre los que podemos contar hematoma, alteraciones de contorno, infección y/o daño temporal de algún músculo o nervio en la

zona lipoaspirada. Por el contrario el procedimiento de lipoinfiltración presenta poca frecuencia de complicaciones, y la mayoría son menores, como son edema, hematoma, infecciones leves y defectos de contorno; otras complicaciones más raras aunque temidas son la embolia intraarterial de lóbulos de TA, que puede conducir a complicaciones graves como afasia, ceguera, colapso cardiocirculatorio, etc., y las infecciones severas de tejidos blandos, como la fascitis necrotizante (2,26,31,32). Afortunadamente, la tasa de estas complicaciones en la lipoinfiltración es extremadamente baja y se pueden evitar con unas mínimas precauciones (infiltrar cuando estamos retirando la cánula para evitar la embolización intraarterial, así como manteniendo una correcta asepsia y profilaxis antibiótica, y evitando también la infiltración intramuscular de la grasa en músculos ricamente vascularizados como el glúteo mayor).

Es importante recalcar que la lipoinfiltración o “lipofilling” suele ser un procedimiento indoloro, con o incluso sin el uso de anestesia local (depende de la zona donde lo vayamos a aplicar, hay zonas donde lo aplicamos que pueden ser insensibles, como algunos lechos post-mastectomía o cuando el lipoinjerto es complemento de colgajos pediculados o libres, que muchas veces no son sensibles al no estar provistos de inervación sensitiva).

5.4 Anatomía e histología del TA

El TA es un tipo de tejido conectivo caracterizado por presentar un mayor contenido en células (células adiposas o adipocitos) que fibras de colágeno o matriz extracelular. La matriz extracelular está compuesta de fibras de colágeno y elastina, células estromales y estructuras neurovasculares. Cada conglomerado de adipocitos o lóbulo adiposo se nutre de un pequeño pedículo vascular. Su principal función es almacenar energía en el cuerpo, aunque también tienen un papel secundario en la termogénesis. Los adipocitos se encuentran de forma aislada o formando grupos dentro del tejido conectivo, aunque en ocasiones se encuentran agregados en grandes grupos y con una organización concreta, es en estos casos cuando hablamos de tejido adiposo como tal.

El TA puede diferenciarse en dos tipos (33,34): el blanco o unilocular, y marrón o multilocular; el primer término hace referencia al color del tejido en la disección macroscópica, y el segundo a la forma que tiene cada uno de almacenar los glóbulos de grasa.

- TA marrón, pardo o multilocular:

Es un TA muy abundante en animales que hibernan, dada su función de termogénesis. En humanos está presente al nacimiento, con una función protectora frente a hipotermia, y va disminuyendo con la edad.

Las localizaciones típicas donde se encuentra, son las regiones interescapular y la inguinal.

En este tejido, las gotas de grasa se almacenan en vacuolas citoplasmáticas múltiples, lo que da a estas células el aspecto multilocular. El núcleo normalmente se encuentra en el centro de la célula, de forma redondeada (Figura 2).

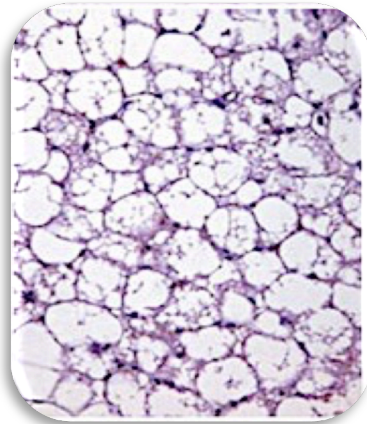


Figura 2.- Corte histológico de tejido adiposo pardo (Tomado de www.bellabeluga.co.uk).

El TA marrón está nutrido por abundantes vasos sanguíneos y fibras nerviosas adrenérgicas. Debido a que es rico en mitocondrias, orgánulos ricos en citocromos, junto con la abundante presencia de lipocromos, presenta ese color pardo o marrón.

▪ TA blanco o unilocular:

El más abundante en el cuerpo humano, y el que utilizaremos en nuestro estudio.

Su contenido son grandes gotas de grasa que colapsan para formar una única vacuola grasa que ocupa la mayor parte de la célula.

De este modo, el núcleo se ve rechazado a la periferia de la célula. El citoplasma también se ve rechazado a la periferia y se observa como una fina lámina atenuada, en la que se puede observar también el núcleo. Estas características han hecho que estas células también sean conocidas como en anillo de sello (Figura 3).

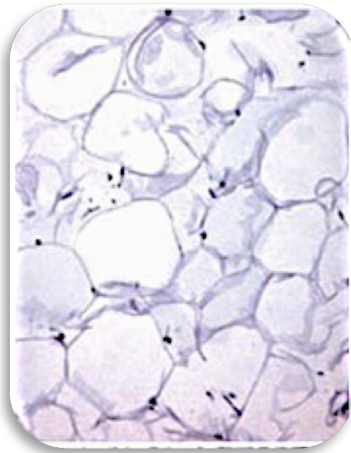


Figura 3.- Corte histológico de tejido adiposo blanco (Tomado de bellabeluga.co.uk).

Una vez se realiza el procesamiento, la grasa normalmente se disuelve con solventes como el xileno, usado en la inclusión en parafina, de tal modo que lo único que permanece es el anillo citoplasmático y el núcleo, rodeando un espacio central vacío. Existen técnicas específicas para visualizar los lípidos.

El aporte sanguíneo al TA blanco es menor que en el TA pardo, aunque se pueden observar abundantes capilares en las secciones histológicas (son estructuras aisladas que contienen células sanguíneas u otros elementos sanguíneos, y se diferencian de los adipocitos porque estos últimos forman agregados).

En general, cuando observamos una célula adiposa individualmente, podemos observar una delgada lámina basal, que puede o no ser visible en las secciones observadas bajo microscopio óptico (Figura 4) (2,33).

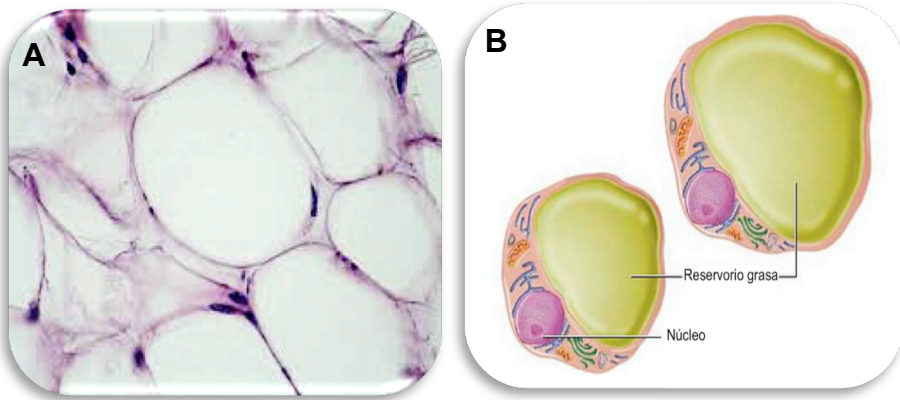


Figura 4.- Corte histológico de tejido adiposo (A). Esquema de la morfología del adipocito (B). (Tomado de: <http://biogeotesttoni.blogspot.com.es> (A); modificado de www.lnl.gov (B)).

El injerto de TA se compone de un conglomerado de células adiposas disgregadas, fragmentos de tejido adiposo, fracción estromal (con otros tipos celulares y las fibras de colágeno y elastina, además de factores de crecimiento), además de restos lipídicos, aceites, etc. procedentes de adipocitos fragmentados; estos últimos son los restos de adipocitos que en el proceso de extracción se han roto por su gran fragilidad.

Una vez se realiza el trasplante del TA, éste se vasculariza y se ve inmerso paralelamente en una reacción inflamatoria: los restos hemáticos y fragmentos adipocitarios son reabsorbidos, llegan abundantes leucocitos a través de los

vasos a la zona del injerto. La infiltración linfocítica e histiocítica es muy evidente al mes de haber realizado el injerto, de modo que los vasos se muestran dilatados, los linfocitos infiltran el estroma y aparece nuevo tejido conjuntivo entre la dermis reticular y la grasa subcutánea. Otros cambios degenerativos que se pueden observar los primeros meses tras el trasplante son la aparición de micro y macro quistes oleosos alrededor de los injertos, que van desapareciendo gradualmente a medida que la inflamación baja (35). Al tercer mes, aparece una cápsula de colágeno tipo I alrededor del lóbulo adiposo autotrasplantado (30).

5.5 Criopreservación de TA

En los últimos años se han desarrollado diferentes estudios acerca de la criopreservación de TA, aunque existe una gran heterogeneidad entre los resultados de los mismos, no solo en las T^a propuestas (desde +4 a -196 °C) (36-38), sino también en el uso o no de distintos tipos de ACPs (37-39). A pesar de las diversas publicaciones existentes, aún no se ha llegado a determinar un protocolo óptimo de criopreservación de TA, ya que la mayoría de estudios hasta el momento presentan puntos débiles en cuanto a metodología, ya sea por los pequeños tamaños muestrales utilizados, los múltiples parámetros recogidos, comparados y asociados que incluyen variables de confusión y falta de protocolos establecidos (3,30,40). Algunos autores llegan incluso a

desaconsejar la criopreservación de TA, en especial estudios donde no se usan ACPs, ya que al congelar directamente el tejido sin añadir un ACP, la mayoría de este se necrosa (41), lo cual podría ser explicado por los efectos deletéreos del propio procedimiento de criopreservación sobre el TA.

Otras de las diferencias metodológicas entre los estudios, son la existencia de una gran heterogeneidad en el modo de recoger y procesar el injerto graso para su preservación, el tiempo de criopreservación (desde 1 semana a años), los métodos para evaluar la viabilidad, etc. Por todo ello las publicaciones existentes presentan a menudo conclusiones contradictorias.

Un protocolo adecuado de criopreservación ha de conseguir un almacenamiento del TA manteniendo una buena viabilidad tras la descongelación. Sin embargo, la propia criopreservación puede suponer una agresión para estas células.

5.5.1 Fisiología básica de la criopreservación

La criopreservación de los tejidos se fundamenta en un aumento de la viscosidad intra y extracelular acompañada de una disminución de la energía térmica libre, la cual no es suficiente para que se lleven a cabo reacciones químicas, y como consecuencia se detienen los procesos biológicos, permitiendo así el almacenaje de las células y tejidos (42).

Ya en los años 70 Mazur y cols. estudiaron los efectos que la criopreservación tiene sobre las células, ya que se establece una salida de líquido intracelular a medida que baja la T^a (43,44).

De acuerdo con estas teorías, los efectos de la criopreservación sobre las células adipocitarias pueden ser deletéreos principalmente por dos razones:

- Deshidratación de las células: en el medio extracelular se forman cristales de hielo a T^a más altas que en el medio intracelular, lo que provoca un aumento en la concentración de solutos, que secundariamente fomenta la salida del agua intracelular (a través de las acuaporinas). Esto puede llevar a deshidrataciones severas de la célula causándole daños irreversibles (42).
- Formación de cristales de hielo intracelular: pueden lesionar orgánulos y la membrana celular.

Ambos efectos descritos pueden dañar la célula irreversiblemente o bien inducir procesos apoptóticos o de necrosis, una vez sean descongeladas.

Estos eventos empiezan a ocurrir con T^a por debajo de -5° , y en función de la velocidad con la que se disminuya la T^a .

A T^a bajo 0° , como por ejemplo -5°C , tanto el medio como la célula suelen permanecer descongeladas “supercool state”. En T^a desde -5°C a -15°C , se forma hielo en el medio externo a la célula, aunque los contenidos intracelulares permanecen descongelados, gracias a la protección de la membrana celular. Los cristales de hielo forman un núcleo a partir del cual crecen. Con la aparición de cristales de hielo extracelulares, se crea un gradiente de fluidos hacia fuera de las células.

Mazur y cols. (43,44) diseñaron en sus estudios de criopreservación celular un modelo matemático en el cual se relacionaba la tasa de enfriamiento y el daño celular, llegando al establecimiento de dos premisas clave:

- Si la tasa de descenso de T^a es lenta, el flujo de fluidos hacia fuera puede provocar una concentración excesiva de los solutos intracelulares, llegando a causar una deshidratación severa antes de que estos fluidos se congelen dentro de la célula.
- Por otro lado, si la tasa de disminución de T^a es muy rápida, no da tiempo a que el agua salga de la célula, el contenido intracelular se congela produciendo cristales de hielo que podrían romper la membrana celular o dañar los orgánulos celulares como las mitocondrias.

Teniendo en cuenta estos dos extremos, el punto ideal para evitar daños celulares sería alcanzar una tasa de descenso de T^a lo suficientemente lenta para permitir una salida de fluidos intracelulares, evitando la formación de cristales de hielo intracelulares, pero lo suficientemente rápida para no llegar a la excesiva concentración de solutos intracelulares y a una deshidratación severa.

Del mismo modo, el proceso de descongelación también puede suponer una agresión para las células si se realiza de un modo muy rápido o demasiado lento.

La adición de sustancias protectoras, los ACPs, sustancias osmóticamente activas que afectarían las tasas de transporte acuoso, y con ella la formación de cristales intracelulares, nos van a servir para modular este gradiente de flujo y evitar las agresiones anteriormente descritas.

5.6 Tipos de ACPs

Los ACPs mejoran la supervivencia de las células criopreservadas, gracias a su capacidad de reducir el punto de congelación y descongelación de las células y disminuir también la tasa de congelación (42).

En la literatura se han descrito múltiples ACPs, tales como glicerol, dimetilsulfoxido (DMSO), trehalosa, sucrosa,

hidroxietilstarch (HES), polivinil piridina (PVP), dextrano, glicerol, etc.

Existe ya poca controversia acerca de si la utilización de ACPs es necesaria para mantener buena viabilidad del TA, (en la literatura científica se pueden encontrar algunos estudios que defienden que no es necesaria su utilización, aunque la mayoría de estudios protocolizados y con análisis de viabilidad defiende su utilización) (45). Lo que sigue siendo un tema de debate, es qué tipo de ACP es el más adecuado para estos fines.

Podemos distinguir dos grandes grupos de ACPs:

- Permeables. Son moléculas de pequeño tamaño capaces de penetrar a través de la membrana celular. Ejercen su efecto reduciendo la formación de hielo tanto dentro como fuera de las células. Además, al poder penetrar dentro de las células, puede llenar espacios intracelulares previniendo la contracción excesiva de las células y con ella la deshidratación severa. Ejemplos son el DMSO o el glicerol, etilenglicol, etc.
- No permeables. Son moléculas de mayor tamaño que se quedan en el espacio extracelular. Tienen varios efectos sobre la célula: al ser no permeables, y osmóticamente activos, favorecen la deshidratación

celular evitando que el agua intracelular se congele. Favorecen también la tendencia a la vitrificación del agua extracelular, en oposición a la formación de grandes cristales de hielo, y por último estabilizan las membranas celulares durante los procesos de congelación y descongelación (46). En ocasiones pueden penetrar dentro de la célula mediante los procesos de pinocitosis. Ejemplos son el HES, la trehalosa, el PVP, etc.

Uno de los ACPs más utilizados históricamente y presente en múltiples estudios, ha sido el DMSO, pero pese a su gran poder de criopreservación, tiene un gran inconveniente que es su gran toxicidad, por lo que obliga a hacer lavados inmediatos tras la descongelación de los tejidos, para eliminar este agente tóxico previo a la infiltración del lipoinjerto en el organismo receptor. Se ha relacionado con reacciones adversas como náuseas, vómitos, hipo e hipertensión, retortijones, diarrea, y alteraciones sistémicas más graves como arritmia cardíaca, encefalopatía, fallo renal y depresión respiratoria (47,48). El hecho de que sea un ACP permeable, obliga a realizar lavados repetidos hasta conseguir eliminarlo, para evitar que una vez infiltremos el TA, se produzcan estos efectos sistémicos indeseables.

En general, los ACPs permeables son peor tolerados que los no permeables, porque al descongelar el tejido o las células, y salir al exterior, se llevan consigo líquido intracelular

causando alteraciones citoplasmáticas, desnaturalización de proteínas, etc. Estos ACPs se han de eliminar de un modo cuidadoso previamente a la utilización del tejido o células descongeladas, por ejemplo mediante la centrifugación (42).

La trehalosa, un ACP no permeable, presenta varias características ventajosas: es un disacárido, no tóxico, con gran poder de hidratación y un punto de cristalización más alto que otros azúcares, de tal manera que protege la membrana celular, manteniéndola intacta después de la deshidratación. Otros efectos beneficiosos que se le atribuyen son que facilita el transporte iónico a través de la membrana, disminuye el punto de fusión de los lípidos de la membrana, maximiza la estabilidad de las proteínas y de la membrana celular en general (49).

El HES es otro ACP no permeable, no tóxico, y que ha sido aplicado con éxito en protocolos de criopreservación de otros tejidos (50,51), así como también para criopreservar TA, siendo un agente ideal para uso clínico (48). Una de sus características es su capacidad para absorber agua (cada gramo de HES puede absorber 0,5 g de agua), y mantenerla en un estado de vitrificación sin ninguna fase de transición en el enfriamiento. Este ACP se ha utilizado clásicamente junto al DMSO, aunque en los últimos años se plantea la posibilidad de que su uso aisladamente podría ser efectivo evitando así los efectos deletéreos del DMSO.

5.7 Aspectos legales y regulación

Las regulaciones de la FDA y la Unión Europea (EU) han dividido los procedimientos de laboratorio según el grado de manipulación y el riesgo derivado, y la criopreservación se ha incluido en los procedimientos de mínima manipulación, considerándolo un procedimiento seguro (52). Los procedimientos que se incluyen dentro de la denominación de mínima manipulación, según las FDA, son aquellas en las que “el procesamiento no altera las características relevantes del tejido en lo relativo a la utilidad del tejido para reconstrucción, reparación o reemplazo”, y también que “el procesamiento no altere las características biológicas relevantes” (42).

:: JUSTIFICACIÓN

6 JUSTIFICACIÓN

Hoy en día los injertos de TA constituyen una de las herramientas fundamentales dentro del campo de la cirugía reconstructiva, siendo de uso cotidiano y cada vez más extendido. Esto es debido a su sencillez y escasa morbilidad, y sus infinitas aplicaciones dentro de la cirugía plástica. De este modo, el TA se ha afianzado como un material de relleno ideal para el uso clínico, aunque aún quedan ciertos detalles técnicos que se han de perfeccionar: simplificar las técnicas de extracción, optimizar la cantidad extraída, mejorar las técnicas de procesamiento, minimizar las pérdidas y maximizar las tasas de prendimiento.

El hecho de que el TA sea un tejido frágil y avascular en el momento que se injerta, la falta de predictibilidad y variabilidad en la tasa de reabsorción, y la dificultad de obtener un resultado óptimo en una sola sesión, conducen a que muy frecuentemente sean necesarios procedimientos adicionales para conseguir el resultado final deseado en el proceso reconstructivo. En general, lo habitual es que sea necesario repetir este tipo de procedimiento para conseguir el resultado deseado, por lo que generalmente se informa al paciente de ello, explicando en la visita preoperatoria que serán precisas varias sesiones de injerto autólogo de grasa para obtener el resultado óptimo.

Gracias al avance en la ingeniería de tejidos nos podemos plantear nuevas cuestiones y nuevos retos clínicos: ¿Qué ocurriría si existiera un método fiable, protocolizado, sencillo y efectivo de criopreservación de TA? A priori se consideraría un gran avance poder disponer de este tipo de procedimiento ya que tendría aplicaciones muy importantes. Por ejemplo en una reconstrucción de mama, en la cual sabemos de entrada que serán necesarias varias sesiones, este protocolo permitiría realizar una primera y única extracción de grasa, con anestesia general preferiblemente para evitar molestias por la paciente, y extraer una cantidad suficiente de TA para las sucesivas sesiones de lipoinjerto. De esta manera utilizaríamos una parte para la primera sesión de injerto autólogo de TA, y el resto se almacenaría mediante el procedimiento de criopreservación para su futuro uso, para aplicarlo en los defectos remanentes o en las zonas en las que se hayan reabsorbido parcialmente los injertos iniciales. Todo ello posibilitaría disponer de una reserva de TA de cada paciente que vaya a ser sometido a una reconstrucción con injertos de grasa, extrayendo una cantidad grande en la primera sesión, conservando el resto, e injertarlo en sesiones posteriores con procedimientos más sencillos utilizando exclusivamente anestesia local. Esto evitaría las repetidas intervenciones con anestesia general y los efectos no deseables de la extracción de grasa.

En contraposición a la lipoaspiración, el procedimiento de infiltración del injerto de TA suele ser indoloro con o incluso

sin el uso de anestesia local (depende de la zona donde lo vayamos a aplicar, hay zonas donde lo aplicamos que pueden ser insensibles, como en el lecho post-mastectomía o como complemento a un colgajo libre), por lo que el procedimiento que más molestias causa y más costes genera, que es la lipoaspiración, sólo se realizaría una vez. Las sucesivas sesiones de injerto de TA, que habríamos criopreservado, podrían idealmente realizarse en una consulta, inyectando el TA a través de finas cánulas, lo cual evitaría el ingreso, un menor uso de medicación, menor uso de quirófano, así como los múltiples gastos directos e indirectos generados (disminución de la estancia hospitalaria, número de procedimientos con anestesia mayor, etc.). Por último la morbilidad generada es mucho menor, con menores molestias y menor estrés por parte del paciente que si estuviera ante una nueva intervención reglada o un nuevo ingreso, así como menor tasa de complicaciones postoperatorias (hematoma, dolor, inflamación...). En general se disminuiría el consumo de recursos (tanto hospitalarios, instrumentales, y medios humanos y materiales...) y la morbilidad al paciente.

La validación de un método de criopreservación de adipocitos demostrando una adecuada viabilidad de las células, podría suponer un gran avance por el enorme campo de aplicaciones que se le podrían asociar a esta técnica reconstructiva, tanto en mama, como en secuelas de quemaduras, lipoatrofia facial, traumatismos, y en general

cualquier deformidad o defecto de contorno; por otro lado supondría grandes ventajas tanto en reducción de costes como en tasas de morbilidad del paciente.

Es por ello que el objetivo de esta tesis doctoral es validar un método de criopreservación de TA que demuestre una conservación óptima y una buena viabilidad de este tejido, para su empleo a posteriori en contexto clínico, con fines reconstructivos. Por otro lado, se pretende también desarrollar un protocolo simplificado y aplicable a nuestra práctica clínica habitual, utilizando T^a de -20°C y -80°C, demostrando que se mantiene la funcionalidad del tejido tras su descongelación y trasplante, manteniendo la viabilidad celular y obteniendo buenas tasas de prendimiento.

:: HIPÓTESIS

7 HIPÓTESIS

1. La utilización del TA para reconstrucción es un procedimiento muy extendido en cirugía plástica; en ocasiones se necesitan varias sesiones de lipoinjerto para obtener un resultado óptimo. La criopreservación podría ser un procedimiento útil en la práctica clínica, al permitir conservar el TA extraído y utilizarlo en sucesivos procedimientos hasta la consecución del resultado final.
2. Los protocolos de criopreservación de TA utilizando T^a de -20°C y -80°C son métodos rápidos, sencillos, con bajo coste, aplicables a la clínica, que podrían ser útiles para preservar la viabilidad y supervivencia del TA.
3. El uso de HES y trehalosa como ACPs en la criopreservación del TA, permitiría mantener una buena viabilidad tisular del TA, dando como resultado además una buena tasa de prendimiento y vascularización del TA una vez injertado en un lecho receptor, además de ser no tóxicos.
4. Estos métodos serían fácilmente aplicables a la práctica clínica.

:: OBJETIVOS

8 OBJETIVOS

8.1 Objetivo principal

El objetivo del presente estudio ha sido desarrollar un protocolo de criopreservación de TA que simplifique significativamente los protocolos desarrollados hasta la fecha sin disminuir la viabilidad y funcionalidad del TA tras su descongelación y trasplante.

8.2 Objetivos secundarios

1. Elaborar distintos protocolos de criopreservación manteniendo la viabilidad del uso de TA criopreservado.
2. Demostrar la viabilidad de los injertos de TA obtenidos mediante los distintos métodos de criopreservación.
3. Aplicar los diferentes protocolos de criopreservación a un modelo experimental “in vivo” con ratones atímicos tipo nude-nu, y comparar las tasas de prendimiento, viabilidad y vascularización “in vivo”, así como las características histológicas.
4. Determinar si el tiempo de criopreservación del tejido adiposo altera las características histológicas y la viabilidad después de su descongelación.
5. Demostrar que el protocolo diseñado es fácilmente aplicable a la clínica y en un futuro sería aplicable a un ensayo clínico con pacientes. Esto permitiría el

ahorro de tiempos quirúrgicos, la disminución de las molestias a los pacientes y un uso más eficiente de los medios disponibles.

:: METODOLOGÍA

9 MATERIAL Y MÉTODOS

9.1 Material y métodos

El presente estudio ha sido llevado a cabo en los laboratorios del Hospital Universitari i Politècnic La Fe de València, así como en los laboratorios del departamento de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universitat de València durante los años 2013-2016. El reclutamiento y selección de pacientes se realizó entre 2013 y 2014 en el servicio de Cirugía Plástica del Hospital Universitari i Politècnic La Fe de València. El período de inclusión de los pacientes fue de 9 meses a partir del 14 de marzo de 2014, hasta el 12 de diciembre de 2014, cuando se dio por finalizado con la inclusión del último paciente.

El estudio contó con la aprobación del Comité Ético de Investigación Biomédica del Hospital Universitari i Politècnic La Fe de València, así como la autorización del Servicio de Sanidad y Bienestar Animal de la Dirección General de Producción Agraria y Ganadería para llevar a cabo la experimentación animal. El presente trabajo fue estructurado en 2 apartados diferenciados con algunos aspectos comunes en cuanto a metodología.

- En primer lugar se llevó a cabo un estudio a nivel cualitativo y cuantitativo de la viabilidad del TA tras la criopreservación mediante dos ACPs diferentes, utilizando dos T^a de congelación diferentes.

- En segundo lugar, una vez seleccionada la T^a de criopreservación y el ACP según los resultados que se obtuvieron en cuanto a una adecuada viabilidad tisular y características morfo-histológicas, y teniendo en cuenta que el protocolo supusiese una ventaja en cuanto a sencillez y rapidez para su aplicabilidad a la práctica clínica habitual, se llevó a cabo un estudio “in vivo” en modelo animal. En este estudio se valoró el prendimiento, viabilidad y vascularización del TA criopreservado tras su incubación en animales de experimentación.

9.2 Selección de pacientes, recogida de muestras y procesamiento

Los estudios realizados en pacientes humanos y la recogida de muestras se llevó a cabo en conformidad con las normas sobre experimentación humana dimanantes del código de Núremberg, declaraciones de Helsinki (1964), Tokio (1975), Venecia (1983), Hong-Kong (1989), Sidney y complementarias, directiva 91/507/CE, R.D. 561/1993, convenio de Bioética del Consejo de Europa (BOE 20-10-99), y código de Ética y deontología médicas vigente.

9.2.1 Selección de pacientes

El número total de pacientes incluidos en este estudio fue de 10. El TA procedente de 4 pacientes fue destinado al estudio

inicial para la selección de T^a y ACP de criopreservación, mientras que el TA de los 6 pacientes restantes fue destinado al estudio “in vivo”. En el estudio fueron incluidos, previo consentimiento informado, una población de pacientes cuyos criterios de elegibilidad y exclusión se detallan a continuación:

Criterios de elegibilidad de los pacientes

a. Criterios de inclusión:

- Hombres y mujeres ≥ 18 años y < 65 años
- Intervenidos/as por patologías locales (no sistémicas).

b. Criterios de exclusión

- Historia previa de tratamiento con citostáticos, corticoides o inmunodepresores.

Previo a la inclusión del paciente en el protocolo se llevó a cabo en la consulta cirugía plástica del Hospital Universitari i Politècnic La Fe el registro de variables tales como: filiación, edad, antecedentes médico-quirúrgicos, peso y altura, Índice de Masa Corporal (IMC), fumador o no fumador, y zona donante de TA así como también se realizaron exploraciones previas a la cirugía (exploración general, y un preoperatorio completo: analítica con hemograma, hemostasia, bioquímica, ECG, RX tórax e interconsulta al Servicio de Anestesia del Hospital Universitari i Politècnic La Fe).

9.2.2 Recogida de muestras y procesamiento

El procedimiento de extracción, procesamiento y manejo de los injertos de TA se realizó siguiendo las directrices del protocolo de Coleman (14,15,26), que se detallan a continuación:

1) Extracción: la grasa se extrajo de zonas donantes seleccionadas por ser fácilmente accesibles y donde existiera TA disponible, siendo abdomen o muslos las localizaciones más frecuentes. En general, este procedimiento se puede realizar bajo anestesia local, regional, epidural o general, dependiendo de la cantidad de grasa que queramos extraer, las preferencias del paciente, el riesgo anestésico, o las características generales de la intervención.

Para la recogida de muestras de este estudio se realizó una incisión de 3 mm con bisturí de hoja 11 para la infiltración de la solución de Klein modificada (1 cc de solución por cada cc de grasa a ser extraído): en la práctica habitual del Servicio del Cirugía Plástica del Hospital Universitari i Politècnic la Fe, el protocolo a seguir consiste en una mezcla de 500 ml de Ringer Lactada Viaflo Hartmann® (Baxter, Deerfield, Illinois, Estados Unidos), con 1 ampolla de 1 ml de adrenalina (1 mg/ml) (B.Braun, Melsungen, Alemania) a una dilución de 1:500.000. En caso de realizar el procedimiento con anestesia local, se añade a la

solución lidocaína (B.Braun) de 10 ml al 5%. Si el procedimiento quirúrgico se realiza bajo anestesia general el uso de lidocaína es evitado debido a su potencial toxicidad para el TA (30). Esta solución infiltrada tiene una triple función: por un lado, el volumen líquido ayuda a disgregar y separar las células adiposas, por otro la adrenalina disminuye el sangrado durante el procedimiento, y por último la lidocaína, en caso de ser utilizada, actúa como anestésico.

El TA fue extraído de forma atraumática evitando la lesión celular, para ello se utilizaron cánulas de 3 mm de diámetro, con 2 orificios distales y de punta roma, conectada a una jeringa de 10 ml con sistema "luer-lock". La cánula fue introducida en la zona donante a través de una pequeña incisión (3 mm aproximadamente) realizando movimientos hacia delante y detrás. Para moderar las presiones de aspiración, se creó presión negativa en la jeringa tirando del émbolo hacia el exterior, de modo que la combinación de la presión negativa y el efecto de curetaje de la cánula, permitieron la recogida del TA.

Para el procesamiento de las muestras de TA tras su extracción se siguió el procedimiento descrito por Coleman (14,15,26) con las siguientes modificaciones. Se llevó a cabo un circuito cerrado, para evitar una posible contaminación del TA, de forma que al desconectar la cánula de la jeringa, el contenido de ésta

se transfirió a tubos colectores mediante conexión tipo “luer-lock”, utilizando el kit Lipopras® (Proteal, Barcelona, España). El TA se transfirió a tubos colectores de 20 ml, con tapa, reduciendo al máximo la exposición del tejido al aire ambiente. La forma de estos tubos está diseñada para encajar en los manguitos esterilizables de la centrifuga Duografter II® (Proteal) (Figura 5), manteniéndose así las condiciones de esterilidad durante todo el proceso.

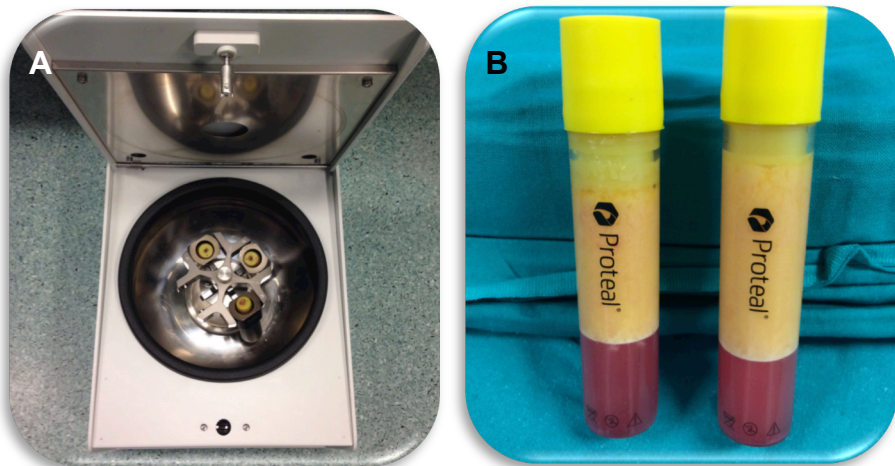


Figura 5.- Procesamiento de muestras, protocolo Coleman. Centrifuga con 3 muestras de TA extraído (A). Tubos colectores de muestras de TA de 20 ml. (B). Obsérvese las diferentes fases que se obtienen tras la centrifugación.

2) Refinamiento: Una vez extraído, el TA se centrifugó durante 3 minutos, a 3000 rpm (alrededor de 1.200 g), siguiendo el protocolo de Coleman (14,15,26). Estas condiciones de tiempo y revoluciones son las indicadas siempre que se trate de una centrifuga

validada para el procesamiento de injertos de TA (14,15,26), en las que el diámetro del rotor es pequeño. Si la centrifugadora es más grande, la fuerza centrífuga a la que es sometida la muestra de TA es demasiado alta y podría dañar a las células adiposas.

Se pueden utilizar diferentes tipos de centrifugadora, pero ajustando las revoluciones por minuto según el diámetro de la centrifugadora (desde el eje hasta el extremo de cada estuche en posición horizontal), para no modificar la fuerza centrífuga relativa (FCR), o “fuerza G” que se ha de mantener en 1.200 g. Esto se puede calcular mediante la siguiente fórmula:

$$\text{FCR (G)} = 1.12 \times \text{radio rotor (mm)} \times (\text{rpm}/1.000)^2$$

La centrifugadora debe tener un rotor central y estuches esterilizables para cada jeringa, para reducir la incidencia de contaminación.

Al final del proceso obtuvimos 3 fases diferenciables:

- Fase situada en la parte inferior: líquido intersticial, restos serohemáticos y elementos acuosos (entre los que se puede incluir la lidocaína).
- Fase intermedia: TA principalmente, aunque también hay presencia de factores de crecimiento. Hay dos tipos de células: las células adiposas maduras; por otro lado, ADSCs, que en

determinadas situaciones podrían diferenciarse hacia TA maduro, así como también tejido vascular, linfático, y actuar como soporte vital de los nuevos tejidos formados (19,20) (Figura 5).

- Fase superior: aceites, lípidos libres que se liberan tras la rotura de algunas membranas plasmáticas adipocitarias. Se les atribuye efectos deletéreos sobre las células adiposas y sobre el prendimiento del injerto, debido a su citotoxicidad. Esta fase se debe decantar o descartar, así como también se puede utilizar papel absorbente estéril o algún algodón, para retirar los restos oleosos que queden.

En nuestro caso, se conecta de nuevo cada colector a jeringas con conexión “luer-lock”, y se aspira en primer lugar la fase superior (aceites) que se descarta. Las jeringas son de 5 ml o 1-2 ml (en función de la zona que vayamos a injertar, en la mayoría de zonas del cuerpo se realizará con jeringas de 5 ml, sin embargo en la cara utilizamos de 1-2 ml para obtener mayor precisión), y volvemos a aspirar el contenido del colector, esta vez sólo la fase intermedia (TA), dejando en el depósito la fase inferior (acuosa).

Se ha de minimizar el tiempo que el TA está en contacto con el aire para evitar la lesión celular (26). Nuestra metodología utilizando los colectores, jeringas y conectores para transferencia del sistema Lipopras®

(Proteal), mantienen la esterilidad durante todo el circuito cerrado, y minimizan el contacto con el aire ambiente.

9.3 Diseño experimental. Selección de T^a y ACP para la criopreservación de TA

Para el estudio y selección de la T^a de criopreservación y ACP del TA se llevó a cabo la obtención de TA humano procedente de liposucción abdominal de un total de 4 pacientes (N= 4), que fue procesado mediante la técnica de Coleman. Con el propósito de que cada una de las muestras de TA de cada una de los pacientes estuviera presente en todos los grupos experimentales, una vez que las muestras fueron recogidas y procesadas, cada una de ellas fueron divididas en 5 fragmentos iguales en cuanto a peso, volumen y tamaño. Cada uno de estos fragmentos fue destinado a los diferentes grupos experimentales (Tabla 1):

- **Grupo Control:** TA fresco (N=4).
- **Grupo 1:** TA criopreservado a -20°C con una solución de Dulbecco's Modified EageL Medium/F2 (DMEM/F2, Gibco, Paisley, Strathclyde, Reino Unido) suplementado con 10% de HES(48) (N=4).
- **Grupo 2:** TA criopreservado a -80°C con una solución DMEM/F2 (Gibco) suplementado con 10% de HES (48) (N=4).
- **Grupo 3:** TA criopreservado a -20°C con una

solución de DMEM/F2 (Gibco) suplementado y 0.35 M trehalosa (Sigma, St. Louis, Estados Unidos) (41) (N=4).

- **Grupo 4:** TA criopreservado a -80°C con una solución de DMEM/F2 (Gibco) suplementado y 0.35M trehalosa (Sigma) (41) (N=4).

		Grupo experimental				
	Muestra	Control (Fresco)	Grupo 1 (HES -20°C)	Grupo 2 (HES -80°C)	Grupo 3 (Trehalosa -20°C)	Grupo 4 (Trehalosa -80°C)
Paciente 1	1	1.1	1.2	1.3	1.4	1.5
Paciente 2	2	2.1	2.2	2.3	2.4	2.5
Paciente 3	3	3.1	3.2	3.3	3.4	3.5
Paciente 4	4	4.1	4.2	4.3	4.4	4.5
Total fragmentos TA= 20		4	4	4	4	4

Tabla 1.- Relación de muestras según paciente y grupo experimental al que fueron destinadas.

Tras una semana el TA fue descongelado, lavado y procesado para su estudio histológico, y estudio de viabilidad (Figura 6).

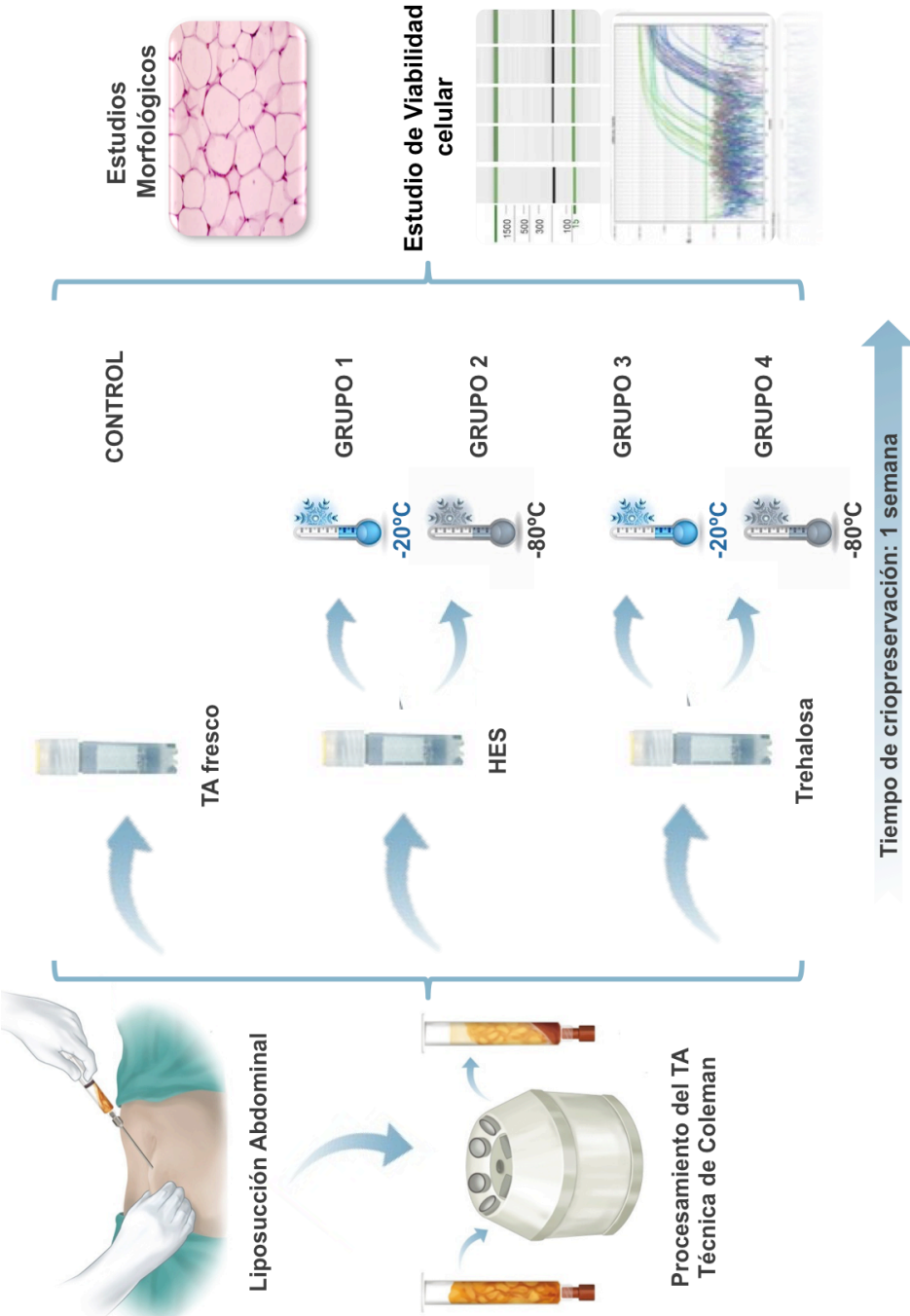


Figura 6.- Diseño experimental de estudio para la selección de Tª y ACP para la criopreservación de TA.

9.4 Criopreservación y descongelación del TA

9.4.1 Congelación

Se mezclaron homogéneamente 15 ml del aspirado del TA con 15 ml de la solución crioprotectora preparada previamente, en tubos falcon de 50 ml. La mezcla fue dividida en diferentes crioviales que fueron incubados a T^a ambiente durante 5-10 min.

Para llevar a cabo el protocolo de congelación lenta, las muestras de los grupos 1, 2, 3 y 4 fueron depositadas en un baño de metanol (Kinetics, Stone Ridge, NY) el cual consigue una disminución de T^a de 1 a 2°C/min, alcanzando -20°C en 20 minutos. A continuación, las muestras de los grupos 1 y 3 fueron depositadas en un congelador a -20°C mientras que las muestras de los grupos 2 y 4, fueron depositadas en un congelador a -80°C. El tiempo de almacenamiento de las muestras de TA a estas T^a, fue de 1 semana.

9.4.2 Descongelación

Los viales con las muestras criopreservadas fueron descongelados mediante inmersión en un baño de agua en agitación a 40°C. La retirada del ACP utilizado en cada uno de los protocolos se llevó a cabo progresivamente a T^a ambiente mediante la dilución e incubación del ACP con DMEM/F2 en concentraciones decrecientes del mismo (50, 25 y 12.5%) durante 5 min. Por último el tejido fue lavado tres veces en medio de cultivo DMEM/F2 a 37°C y 5% CO₂.

9.5 Modelo animal. Estudios “in vivo”

Todos los protocolos de experimentación animal que se utilizaron en este trabajo de investigación se atienen a lo dispuesto en la normativa legal vigente y en particular en el Real Decreto 1201/2005 de 21 de Octubre sobre protección de animales, utilizada para experimentación y otros fines científicos y de acuerdo con la directiva 86/609/CEE, de 14 de Noviembre de 1986 en relación a la toma de muestras de animales.

Los estudios “in vivo” se llevaron a cabo tal y como describe Cui y cols. (2007) (41), salvo algunas pequeñas modificaciones. Quince ratones macho (Hsd: Athymic Nude-nu, Harlan Ibérica S.L, Barcelona, España) de 5 semanas de edad (Figura 7), fueron estabulados en jaulas con filtro, en el interior de cabinas de protección.



Figura 7.- Ratón transgénico Athymic Nude-nu utilizado como modelo experimental in vivo para el estudio de la viabilidad y prendimiento de los implantes de TA humano (Tomado de Novella-Maestre E, Acción antiangiogénica de los agonistas dopaminérgicos en lesiones endometriósicas. Universidad de Valencia, 2008).

La Tª ambiente fue fijada de $21\pm 1^\circ$ C, con ciclo de luz/oscuridad de 12/12h y humedad relativa del $55\pm 10\%$ y un nivel 2 de bioseguridad en la instalación. Los ratones fueron mantenidos con alimentación *ad libitum* con pienso irradiado y agua autoclavada. La manipulación de animales se realizó siempre en el interior de campana de flujo laminar.

Los animales fueron sometidos a solamente un proceso invasivo a la edad de 6 semanas, para la inserción de los implantes de TA en el tejido celular subcutáneo del dorso de cada ratón. Para realizar el implante, todos los animales fueron sedados mediante la administración de cloruro mórfico al 2% (B.Braun) y anestesiados durante la operación por inhalación con isofluorano al 4% (B.Braun). A continuación se procedió a la confirmación de que el animal no respondía al pinzamiento de la pata (monitorización anestesia). Se aplicó una solución antiséptica (Povidona Iodada 10%) sobre la piel del dorso de los ratones, previamente a la implantación. Las diferentes muestras procedentes de 6 pacientes fueron obtenidas y procesadas de la misma forma que se detalla en el Apartado 9.2.2. y asignadas a los diferentes grupos experimentales con el procesamiento correspondiente en cada caso. Se implantaron en cada ratón dos injertos de TA, a través de una pequeña incisión, con la ayuda de una cánula, uno en la parte más craneal del dorso del ratón y otro más caudal, con adecuada separación entre ambos (al menos 1,5 cm). Cada implante fue correctamente identificado y caracterizado (peso, volumen.....) previamente a su

implantación. Estos procesos invasivos se llevaron a cabo con material estéril, en una campana de flujo laminar y sobre una manta eléctrica para evitar la hipotermia. Todo el material fue previamente esterilizado por autoclave. Tras la intervención, se utilizó el analgésico postquirúrgico Buprex® (RB Pharmaceuticals, Richmond, Estados Unidos).

La lipoinfiltración o depósito del injerto de TA se realizó también siguiendo el protocolo de Coleman (14,15,26) utilizando cánulas finas y jeringas de 1 cc. El diámetro de la cánula de infiltración fue de 25 g, roma, y con un solo orificio distal. El método de injerto se depositó usando presiones muy bajas de infiltrado, realizando múltiples pases de cánula (técnica multitrazado) en el plano subcutáneo del dorso del ratón y depositando pequeños acúmulos de TA, con el objetivo de buscar así la mayor supervivencia adipocitaria posible (26).

La incisión fue cerrada mediante una sutura tipo Monosyn 6/0 (B.Braun), volviéndose a aplicar la solución antiséptica (povidona Iodada 10%) después de la intervención.

Los animales fueron divididos en 5 grupos:

- **Grupo Control:** injerto de aspirado de TA fresco (N=6).
- **Grupo A:** injerto de aspirado de TA criopreservado (T^a -20°C; DMEM/F2 suplementado con 10% de HES). (N=6) Tiempo de criopreservación 1 mes.

- **Grupo B:** injerto de aspirado de TA criopreservado (T^a -20°C ; DMEM/F2 suplementado con 10% de HES) (N=6). Tiempo de criopreservación 2 meses.
- **Grupo C:** injerto de aspirado de TA criopreservado (T^a -20°C ; DMEM/F2 suplementado y 0.35 M trehalosa) (N=6). Tiempo de criopreservación 1 mes.
- **Grupo D:** injerto de aspirado de TA criopreservado (T^a -20°C DMEM/F2 suplementado y 0.35 M trehalosa) (N=6). Tiempo de criopreservación 2 meses.

Las muestras de TA de todos los pacientes estuvieron presentes en todos los grupos experimentales. Para ello, el TA de los pacientes incluidos en el estudio se extrajo y procesó en el mismo día, de forma que el fragmento destinado al grupo control (TA en fresco), fue trasplantado en los animales el mismo día de su extracción, mientras que el resto de los fragmentos fueron criopreservados según los protocolos establecidos. Los fragmentos de TA criopreservados de cada uno de los pacientes fueron descongelados y trasplantados en los animales tras 1 y 2 meses de criopreservación, tal y como se detalla cronológicamente en la Tabla 2. De esta forma, fue necesaria una estabulación seriada de los animales, de acuerdo con las tres sesiones sucesivas de implantación.

	Fecha de extracción	Nº fragmento	Grupo destino	Fecha de criopreservación	Fecha de descongelación y/o implante	Fecha de sacrificio y recogida de muestras
Paciente 1	15-dic-14	1.1	Control	-----	15-dic-14	15-ene-15
		1.2	A	15-dic-15	15-ene-15	16-feb-15
		1.3	B	15-dic-15	16-feb-15	16-mar-15
		1.4	C	15-dic-15	15-ene-15	16-feb-15
		1.5	D	15-dic-15	16-feb-15	16-mar-15
Paciente 2	15-dic-14	2.1	Control	-----	15-dic-14	15-ene-15
		2.2	A	15-dic-15	15-ene-15	16-feb-15
		2.3	B	15-dic-15	16-feb-15	16-mar-15
		2.4	C	15-dic-15	15-ene-15	16-feb-15
		2.5	D	15-dic-15	16-feb-15	16-mar-15
Paciente 3	15-dic-14	3.1	Control	-----	15-dic-14	15-ene-15
		3.2	A	15-dic-15	15-ene-15	16-feb-15
		3.3	B	15-dic-15	16-feb-15	16-mar-15
		3.4	C	15-dic-15	15-ene-15	16-feb-15
		3.5	D	15-dic-15	16-feb-15	16-mar-15

Tabla 2. Cronología de extracción, criopreservación e implante de las muestras. Parte 1 / 2.

	Fecha de extracción	Nº fragmento	Grupo destino	Fecha de criopreservación	Fecha de descongelación y/o implante	Fecha de sacrificio y recogida de muestras
Paciente 4	15-dic-14	4.1	Control	-----	15-dic-14	15-ene-15
		4.2	A	15-dic-15	15-ene-15	16-feb-15
		4.3	B	15-dic-15	16-feb-15	16-mar-15
		4.4	C	15-dic-15	15-ene-15	16-feb-15
		4.5	D	15-dic-15	16-feb-15	16-mar-15
Paciente 5	15-dic-14	5.1	Control	-----	15-dic-14	15-ene-15
		5.2	A	15-dic-15	15-ene-15	16-feb-15
		5.3	B	15-dic-15	16-feb-15	16-mar-15
		5.4	C	15-dic-15	15-ene-15	16-feb-15
		5.5	D	15-dic-15	16-feb-15	16-mar-15
Paciente 6	15-dic-14	6.1	Control	-----	15-dic-14	15-ene-15
		6.2	A	15-dic-15	15-ene-15	16-feb-15
		6.3	B	15-dic-15	16-feb-15	16-mar-15
		6.4	C	15-dic-15	15-ene-15	16-feb-15
		6.5	D	15-dic-15	16-feb-15	16-mar-15

Tabla 2. Cronología de extracción, criopreservación e implante de las muestras. Parte 2 / 2.

A los 15 días tras la implantación en cada grupo de animales, se llevó a cabo un control visual macroscópico, de los ratones y de cada uno de los injertos (Figura 8).

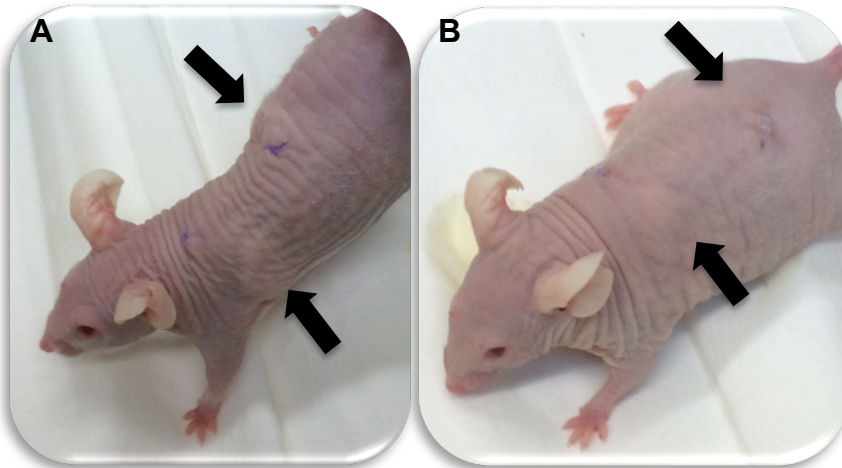


Figura 8.- Control macroscópico de ratones e injertos a los 15 días. Ratón con injertos del grupo A (TA criopreservado con HES durante 1 mes) (A). Ratón con injertos del grupo D (TA criopreservado con HES durante 2 meses) (B). Se pueden apreciar los injertos de TA (flechas) en ambas figuras.

Tras un mes de la implantación del TA en los animales se procedió al sacrificio de los mismos mediante inhalación de CO₂. De cada uno de los ratones se realizó un análisis macroscópico morfológico con el fin de evaluar alguna posible alteración o infección como consecuencia del proceso de implantación del TA. Se llevó a cabo la extracción de cada uno de los implantes de TA humano, determinándose su peso y volumen, y se destinó un fragmento para su inclusión en parafina y su posterior análisis histológico, y el resto de la muestra se guardó para su estudio de viabilidad y vascularización mediante análisis moleculares (Figura 9).

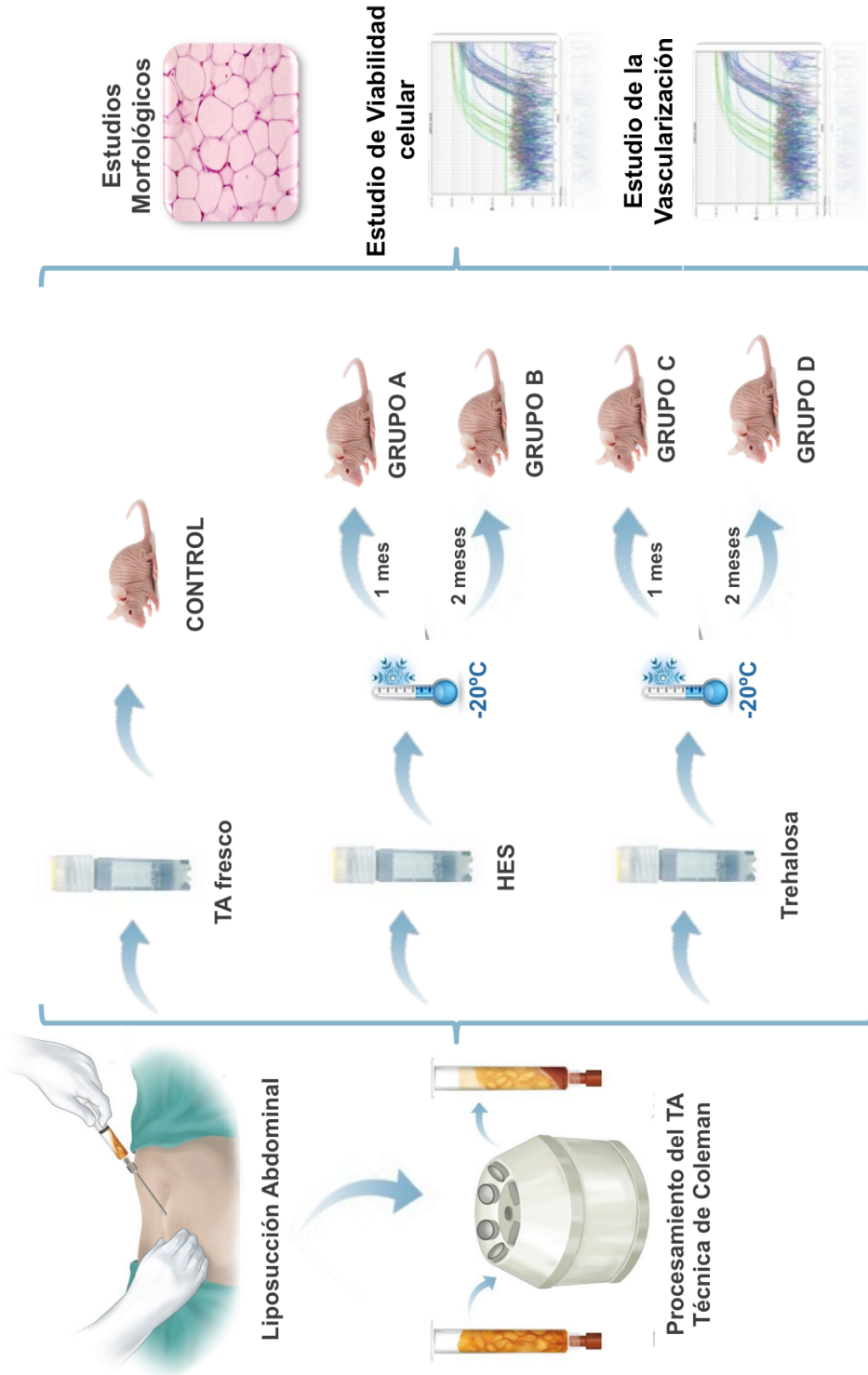


Figura 9.- Diseño experimental del modelo animal.

9.6 Estudios histopatológicos

Cada una de las muestras fue analizada mediante microscopía óptica siguiendo el protocolo que se describe a continuación:

9.6.1 Fijación

Este proceso se refiere al conjunto de tratamientos de los tejidos con sustancias químicas u otros procedimientos, de manera que se mantienen las células estructuralmente intactas. Esto se logra al inactivar ciertas enzimas celulares que de otra manera iniciarían la autólisis y llevarían a la degeneración post-mortem. La fijación mantiene las estructuras al estimular la formación de enlaces cruzados entre las proteínas. Las muestras fueron fijadas en formaldehído al 4% (Gibco).

9.6.2 Lavado

Es necesaria la eliminación del exceso de fijador para evitar una posterior interferencia química en el proceso de inclusión. Los medios de inclusión utilizados son hidrófobos y precisan de la eliminación del agua del tejido, por ello, se realizó una deshidratación del tejido con etanol. Debido a que una gran parte del tejido está constituido por agua, se aplicó una serie gradual de soluciones acuosas de menor a mayor grado del agente deshidratante. Este paso se realizó de forma gradual ya que si se somete directamente el tejido a soluciones de etanol absoluto, éste se deformaría debido a

que el agua tisular saldría muy rápidamente de la muestra.

Por lo tanto, se procedió a la deshidratación de las muestras en alcohol de gradación decreciente (50, 70, 80, 90%) y finalmente se sumergieron en 3 pases de alcohol absoluto (Panreac, Barcelona, España).

9.6.3 Aclaramiento o diafanización

Una vez deshidratado el tejido, se pasa a una solución de una sustancia que es miscible tanto con el alcohol como con el medio de inclusión a utilizar. La sustancia comúnmente utilizada es el xileno o xilol. Este proceso se llama aclaramiento ya que el tejido se torna transparente o claro en el xileno, esto se debe a que cambia su índice de refracción.

Una vez deshidratadas las muestras, se aclararon mediante pasos sucesivos en xilol (Panreac) para extraer el agente deshidratante.

9.6.4 Inclusión

Por lo general, los tejidos son estructuras blandas y frágiles, incluso después de la fijación. Previo a la obtención de los cortes, es necesario incluirlos en un medio de soporte. En estado líquido, estos medios tienen la capacidad de penetrar y rodear el tejido, de esta forma se puede producir el endurecimiento (por enfriamiento o por polimerización), para formar un bloque sólido que pueda ser cortado fácilmente en el microtomo.

Las muestras fueron depositadas individualmente en recipientes con parafina fundida a 60°C y se dejaron en la estufa durante 1 h a 60°C para que el xilol se evaporase y los espacios anteriormente ocupados por éste fuesen ocupados por la parafina. Este paso se repitió una vez más para eliminar la mayor cantidad de xilol posible de cada muestra. Después se colocaron las piezas en parafina fundida en un molde de metal rectangular, orientadas de forma adecuada y se dejaron solidificar a T^a ambiente.

9.6.5 Corte

El bloque de parafina con el tejido se puede cortar en secciones lo suficientemente delgadas como para permitir el paso de la luz. La mayor parte de los preparados para microscopía óptica tienen un grosor de 4 µm.

Una vez obtenidos los bloques de parafina con cada una de las muestras, se realizaron cortes de 4 µm de espesor. Para la obtención de estos cortes se utilizó el microtomo (Microm GMBH, tipo HM310, Walldorf, Alemania) con cuchillas de acero. Estos cortes se depositaron en un baño termostatzado a 37°C para eliminar las arrugas y pliegues debidos al corte. A continuación fueron recogidos con portaobjetos SuperFrost® Plus, Menzel-Gläser (Thermo Scientific, Massachusetts, Estados Unidos) para mejorar la adherencia de los mismos. Finalmente los cortes fueron guardados en una estufa a 37°C durante 48-72 horas para mejorar su secado y adhesión final.

9.6.6 Tinción y montaje

La tinción de los elementos estructurales de los tejidos específica y de manera diferencial es indispensable para optimizar su visualización.

Las muestras fueron desparafinadas durante 1 hora en estufa a 60°C, a continuación los portaobjetos se colocaron en cestillas de tinción y fueron sumergidos en xilol durante 5 minutos para terminar de eliminar los restos de parafina, repitiendo este paso 4 veces. Posteriormente las muestras se rehidrataron con concentraciones decrecientes de alcohol (90, 80, 70, 50%) hasta llegar a agua destilada, procediéndose seguidamente a la tinción: Hematoxilina de Harris (Sigma) previamente filtrada 15 minutos, lavado en agua corriente 5 minutos, lavado en agua corriente 10 minutos y Eosina alcohólica (Sigma) previamente filtrada 5 minutos. Tras la tinción, las muestras fueron deshidratadas con concentraciones crecientes de alcohol (50, 70, 80, 90, 100%) hasta llegar a xilol donde permanecieron durante 6 minutos.

Posteriormente las muestras fueron montadas de forma permanente con cubreobjetos con una base de pegamento (Eukitt, Kinder GmbH & Co, Freiburg, Alemania) como soporte para el mismo. Las muestras fueron guardadas a T^a ambiente hasta su posterior análisis mediante microscopía óptica.

9.6.7 Observación y fotografía

Las muestras fueron analizadas bajo microscopio óptico (LEICA DM4000B; Leica, Solms, Alemania) con sistema digital de captación de imágenes (Leica DFC450C). La observación se llevó a cabo en cortes seriados, a distintos niveles para cada uno de los implantes, con la intención de obtener unos resultados más objetivos de la globalidad del tejido. Para visualizar estas imágenes se utilizaron los objetivos de 5x, 10x, 20x y 40x.

9.7 Estudios moleculares

9.7.1 Extracción de ARNm

El ARN total se aisló utilizando el reactivo Trizol (Invitrogen, California, Estados Unidos) siguiendo las instrucciones del fabricante. Tras añadir 500µl de Trizol y disgregar el tejido con la ayuda de un bisturí estéril, se añadió 100µl de cloroformo (Sigma). Después de una centrifugación a 13.000 rpm durante 15 min y a 4°C se transfirió la fase acuosa a otro tubo y se le añadió 250 µl de isopropanol (Sigma). Tras una incubación durante 10 min a T^a ambiente, se centrifugó a 13.000 rpm durante 10 min a 4°C. El precipitado fue lavado con 500µl de etanol al 75% en agua DEPC (Dietilpirocarbonato) filtrado y centrifugado a 7.500 rpm durante 5 min. Finalmente tras secarse los “pellets” de ARN se resuspendieron en 12µl de agua estéril libre de nucleasas.

9.7.2 Análisis de la concentración del ARN

El análisis de la cantidad e integridad del ARN extraído de cada una de las muestras se llevó a cabo mediante métodos espectrofotométricos (Nanodrop™, Thermo Scientific). Este equipo mide la absorbancia de todas las moléculas de la muestra que absorben a la longitud de onda de interés, desde nucleótidos, ARN, ADN monocatenario, y ADN de doble cadena. Todas ellas absorben a 260 nm y contribuirán a la absorbancia total de la muestra.

Se utilizó un ratio de absorbancia de 260/280 nm para medir la pureza del ARN y del ADN. La muestra se considera pura si presenta un ratio alrededor de 1,8 si se trata de ADN y de 2,0 si se trata de ARN. Si el ratio es menor indica la posible presencia de proteínas u otros contaminantes que absorben cercanos a la longitud de onda de 280 nm (Figura 10) (53).

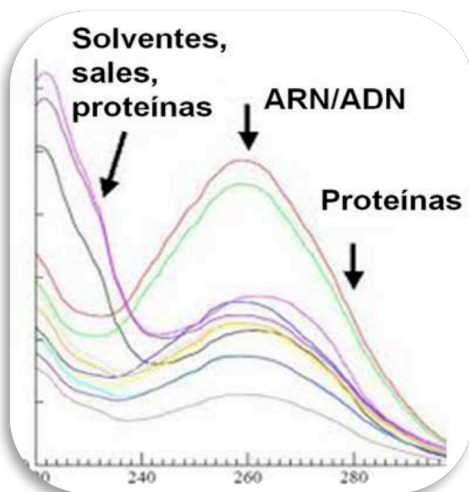


Figura 10.- Gráfica de absorbancias de muestras de ARN o ADN. Se muestra las absorbancias en las que absorben el ARN/ADN y los posibles contaminantes de las muestras, como proteínas, solventes y sales (Tomado de Novella-Maestre E, *Acción antiangiogénica de los agonistas dopaminérgicos en lesiones endometriósicas*. Universidad de Valencia, 2008 (53)).

9.7.3 Retrotranscripción

La retrotranscripción del ARN se llevó a cabo mediante el kit AdvantageRT-for-PCR kit (Clontech, Palo Alto, California, Estados Unidos). Para cada muestra se añadió entre 0,2-1 µg de ARN a un tubo estéril de 0,2 ml y un 1µl de oligo (dT) a 20 µM (oligonucleótidos de unión aleatoria a la cadena de ARNm y que sirven como molde para la enzima retrotranscriptasa). Se incubó durante 5 minutos a 72°C y posteriormente se añadió una mezcla de: 4µl 5x reacción tamponada, 1µl desoxiNTP (desoxinucleótidos) (10mM), 0,5µl de inhibidor recombinante de la ribonucleasa (40 U/µl)y 1µl(200 U/µl) de la transcriptasa inversa del virus de la leucemia murina de Molowny (MMLV). Tras mezclar todos los componentes, las muestras se incubaron durante 1 hora a 40°C, seguido de una segunda incubación a 72°C durante 10 minutos para detener la síntesis de ADNc y paralizar la actividad de la desoxirribonucleasa. Finalmente la cantidad de ADNc se cuantificó mediante métodos espectrofotométricos. La muestra fue diluida con agua libre de ARN a una concentración final de 100 ng/µl y fue almacenada a -20° C hasta la realización de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa o PCR estándar (siglas de su nombre en inglés Polymerase Chain Reaction), así como la técnica PCR cuantitativa a tiempo real o RT-qPCR (siglas de su nombre en inglés, Real-Time quantitative PCR).

9.7.4 PCR estándar. Expresión génica de GAPDH

Para evaluar la posible degeneración que los diferentes fijadores y condiciones de criopreservación pueden ejercer sobre el TA y llevar a cabo una estimación preliminar de la viabilidad de los tejidos criopreservados en el estudio de la selección de T^a y ACP para la criopreservación de TA (apartado 9.3), se realizó un análisis cualitativo de la expresión génica de GAPDH mediante la técnica de PCR.

La síntesis de proteínas es esencial para el mantenimiento de los órganos y los tejidos del cuerpo ya que son las que determinan las propiedades específicas de éstos y en consecuencia su funcionalidad.

La GAPDH es una proteína ligada a numerosas funciones celulares, lo cual hace que su detección sea objeto de estudio. En un cultivo celular o tejido la presencia de esta proteína evidenciaría que las células cumplen su ciclo de manera normal y que no se ve alterado por factores externos en contacto con ellas, como biomateriales, suplementos, entre otros.

Se trata de una proteína multifuncional, capaz de ejercer diferentes funciones según su localización subcelular, estado oligomérico o interacciones con otras proteínas o ligandos (54,55). Existe un gran número de estudios que demuestran la implicación de GAPDH en diversos procesos celulares en mamíferos como transporte y fusión de membranas,

ensamblaje de microtúbulos, regulación transcripcional, exporte de ARN, replicación y reparación de ADN y apoptosis entre otros.

Además, los adipocitos han demostrado claramente características específicas de la actividad de la GAPDH, cual es un marcador tardío de la diferenciación adipocitaria (56).

La PCR es una técnica de biología molecular que permite generar una gran cantidad de copias de un fragmento de ADN. Con la PCR, cantidades mínimas de material genético pueden ser amplificadas millones de veces en pocas horas permitiendo la detección rápida y fiable de los marcadores genéticos de marcadores implicados en diferentes procesos fisiológicos y patológicos.

9.7.4.1 Componentes de la PCR

Sabemos que el objetivo de la reacción en cadena de la polimerasa es obtener muchas copias de un fragmento de ADN, para después poder visualizar este fragmento y utilizarlo en otras aplicaciones si es necesario. Los siguientes cuatro componentes que son los elementos básicos que es necesario incorporar a la reacción para que se complete una PCR.

- ADN molde: El ADN a partir del cual queremos obtener una copia de un fragmento, es decir, el ADN que queremos amplificar.
- Enzima ADN polimerasa: Una enzima capaz de generar una copia de ADN a partir del ADN molde.

La reacción se lleva a cabo en un tampón apropiado para el funcionamiento de la enzima polimerasa. Cofactores: como cofactores de la polimerasa se añaden cationes divalentes, generalmente en forma de cloruro de magnesio ($MgCl_2$).

- **Iniciadores de la reacción:** Las enzimas ADN polimerasas únicamente son capaces de añadir nucleótidos al extremo 3' libre de una doble cadena de ADN. Son necesarios por tanto moléculas cortas (entre 10 y 30 bases) de ADN de cadena sencilla. Estas moléculas son los cebadores o primers de la reacción que van a delimitar el fragmento a amplificar.
- **Nucleótidos libres:** las enzimas ADN polimerasas van a crear una cadena complementaria a la cadena molde mediante la incorporación de nucleótidos al extremo 3' libre del cebador que se ha unido a la cadena molde. Los nucleótidos se añaden en forma de desoxirribonucleósidos trifosfato (dNTPs).

9.7.4.2 Proceso de la PCR

La PCR está diseñada según el principio natural de replicación del ADN. El proceso que tiene lugar durante la PCR se puede resumir de la siguiente forma: partiendo de un ADN molde, una enzima polimerasa incorpora nucleótidos complementarios a partir de la zona de doble cadena originada por la unión de los cebadores al molde. Es un

proceso de tres pasos (Figura 11), designado como un ciclo, que se repite un número específico de veces.

Un ciclo de PCR consiste en los siguientes pasos:

- **Desnaturalización:** la primera reacción consiste en la desnaturalización del ADN, en la cual las cadenas de ADN son calentadas y separadas por ruptura de los enlaces de hidrógeno a una T^a de 95 °C durante 20-30 segundos. El tiempo depende de la secuencia del ADN molde, es decir, si la cantidad de G-C es alta, será necesario más tiempo para romper sus uniones debido a que el apareamiento de estas bases está formado por tres enlaces, uno más que las bases de A-T. Al final de esta etapa tendremos las cadenas separadas que servirán como molde para el siguiente paso.
- **Alineamiento:** la segunda reacción es la hibridación de los primers que consiste en la alineación de los primers al extremo 3' del ADN molde previamente separado e hibridación con su secuencia complementaria. Para que se forme el complejo molde-primers se baja la T^a y las condiciones serán tales que se facilitará la unión de los primers a las cadenas. La T^a y el tiempo requerido para el alineamiento de los primers depende de la composición, tamaño y concentración de los primers amplificadores. Una T^a de alineamiento óptima es 5°C por debajo de la T_m de los primers. Debido a

que las ADN polimerasas son activas en un amplio rango de T^a , la extensión de los primers puede ocurrir a bajas T^a incluyendo el paso de alineamiento. El rango de actividad de las enzimas varía en dos ordenes de magnitud entre 20 y 85°C. Las T^a de alineamiento en el rango de 55 a 72°C genera buenos resultados.

- **Elongación:** por último, en la fase de elongación o extensión, la enzima polimerasa lleva a cabo su acción incorporando nucleótidos complementarios a partir del extremo 3' libre de la región en que han hibridado los cebadores. La T^a a la que se lleva a cabo esta fase depende de la enzima polimerasa empleada; si se utiliza Taq polimerasa la T^a de elongación suele ser de 72°C. El tiempo de extensión depende de la longitud y concentración de la secuencia molde y de la T^a . Las estimaciones para la tasa de incorporación de nucleótidos a 2°C varía de 35 a 100 nucleótidos/segundo dependiendo del buffer, pH, concentración de sales y la naturaleza del molde.

Estas tres fases constituyen un ciclo de la PCR. Este proceso tiene lugar en un termociclador, un instrumento que automáticamente controla y alterna las T^a durante períodos programados de tiempo para el número apropiado de ciclos de PCR.

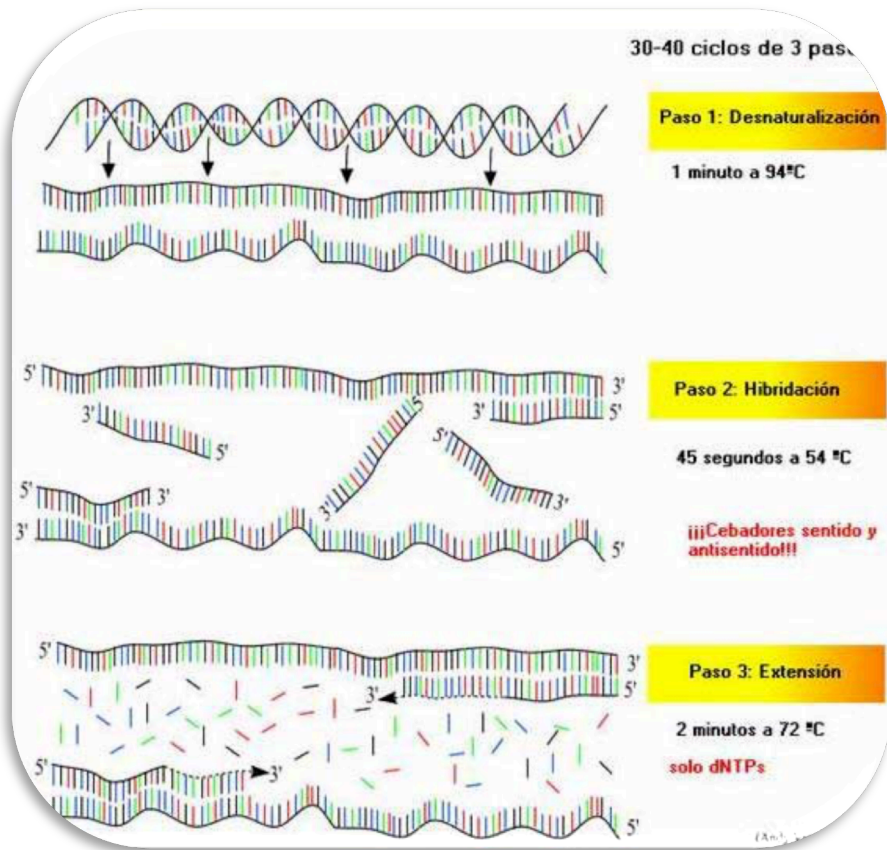


Figura 11.- Pasos que constituyen el proceso de la PCR estándar (Tomado de Andy Vierstracte 1999).

En este primer ciclo, los fragmentos generados no tienen el mismo tamaño: la copia de cada una de las cadenas se inicia, a partir del extremo 3', en el punto en el que el cebador hibrida con el ADN molde y termina en el momento en el que la enzima polimerasa no es capaz de añadir más nucleótidos (es decir, que la nueva cadena formada no tiene un tamaño definido).

La PCR se completa repitiendo entre 25 y 35 veces las tres fases descritas previamente, es decir, realizando entre 25 y 35 ciclos. Si se analiza lo que sucede a partir del primer ciclo se comprueba que tras varios ciclos se forman fragmentos cuyo tamaño está limitado por los puntos en los que hayan hibridado los cebadores o primers (Figura 11). De hecho, transcurridos varios ciclos más, los fragmentos mayoritarios serán aquellos limitados en sus extremos por los cebadores.

Si no tenemos en cuenta el hecho de que hacen falta algunos ciclos para que la mayor parte de los fragmentos estén limitados por los cebadores, podemos considerar que por cada ciclo que se completa se duplica la cantidad de fragmento a amplificar. Es decir, que al final del proceso se obtiene aproximadamente una cantidad de fragmento igual al producto de la cantidad inicial de ADN molde por 2^n , siendo n el número de ciclos. Como dato para apreciar la cantidad de copias que se generan, en el ciclo 20 se ha multiplicado por más de un millón la cantidad inicial de ADN molde.

Este estudio se llevó a cabo en un termociclador Veriti® Thermal Cycler (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, Estados Unidos) (Figura 12). Para cada 45 μ l de reacción de PCR, se mezclaron 1 μ l de ADNc (100 ng), 32 μ l de agua destilada libre de ARN, 5 μ l de dNTPs (2 mM, PE Life Technologies, Foster City, California, Estados Unidos), 5 μ l de “primers” (Tabla 3), 1U de la enzima Taq DNA Polymerase (Roche, Molecular Biochemicals, Mannheim, Alemania) y 5 μ l de tampón 10x proporcionado por la misma casa comercial. Las

condiciones de PCR fueron las siguientes: 5 min a 95°C durante la desnaturalización, seguido de 40 ciclos de tres pasos de 30 s a 95°C y 1 min a 55°C y 30s a 72°C. Finalmente se llevó a cabo un proceso de extensión durante 10 min a 72°C.



Figura 12.- Termociclador en el que se llevó a cabo el proceso de la PCR estándar (A). Pocillos en los que se depositaron las muestras de ADN y mezcla de reacción (B) (Tomada de www.thermofisher.com).

Gen	Referencia secuencia
18S	Fw: 5'-gtaacccgtgaacccatt-3' Rw: 5'-ccatccaatcggtagtagcg-3'
GAPDH	Fw: 5'-agggctgctttaactctggt-3' Rw: 5'-cccactgatttggaggga-3'

Tabla 3.- “Primers” utilizados en el estudio molecular mediante PCR estándar para cada uno de los genes analizados.

9.7.4.3 Normalización y controles endógenos

En el caso de los ensayos de PCR para medir expresión génica, es necesario corregir la variación entre muestras. En este proceso se compara la cantidad del ARNm en dos muestras diferentes. En cada una de las muestras se mide la

cantidad del ARNm de interés en relación con la cantidad del ARNm de referencia, valor el cual teóricamente, es constante. La proporción ARNm blanco/ ARNm referencia se usa para comparar la cantidad del ARNm blanco en las muestras.

Los resultados obtenidos se normalizan con ayuda de un control, el ARNm referencia. Generalmente, este control es un gen que de manera ideal debe expresarse constante e independientemente de las condiciones experimentales, del tratamiento de las muestras, así como en los diferentes tejidos o tipos celulares.

Existen varios tipos de controles endógenos:

- Genes constitutivos: tales como los genes de la GAPDH y de la alfa-actina. Estos son los más usados. Sin embargo, gracias a la sensibilidad de la PCR en tiempo real, se ha observado que en realidad, algunos procesos biológicos o el uso de diferentes tipos celulares afectan su expresión. Por lo tanto, es necesario validar la estabilidad de la expresión del gen control en las condiciones de un experimento a realizar antes de usarlo para llevar a cabo la normalización.
- Genes del ARN ribosomal (ARNr): generalmente, se utiliza el 18S. Estos ARNr son sintetizados por una polimerasa distinta a la que sintetiza los ARNm, por lo tanto la expresión del ARNr está afectada mucho

menos por el tratamiento a que se hayan sometido las muestras (57).

- ARN total: la concentración del ARN total se usa también para normalizar la expresión de genes. Esta normalización tiene dos inconvenientes. Uno, la cuantificación del ARN tiene que ser muy precisa, por lo que los métodos espectro-fotométricos que se utilizan rutinariamente no pueden ser empleados y el proceso de normalización depende directamente de la cuantificación del ARN. Dos, la concentración del ARN total está afectada por distintos procesos celulares (58).
- ARNm múltiples: se utilizan varios genes constitutivos y se obtiene un factor de normalización proveniente de la media de los niveles de expresión. El uso de varios ARNm constitutivos es el método más aceptado en la actualidad para normalizar los datos en la expresión génica, minimiza los problemas mencionados con los otros métodos (59).

En este estudio se utilizó como control endógeno el ARN ribosomal 18S debido a que ha sido demostrado que su expresión está mucho menos afectada por el tratamiento (57), en este caso de procesamiento, congelación y descongelación, al que fueron sometido las muestras de TA.

9.7.4.4 Identificación de los productos de PCR

El hecho de que las moléculas de ADN obtenidas al finalizar la PCR correspondan efectivamente al fragmento de interés queda asegurado por la intervención de los “primers” que definen los extremos derecho e izquierdo de ese fragmento. Así, una vez que la reacción ha finalizado, el tamaño del fragmento multiplicado puede determinarse sometiendo los productos de la reacción a una electroforesis en gel de agarosa o poliacrilamida, es decir, a un proceso de separación por difusión bajo la acción de un campo eléctrico.

La electroforesis consiste en la separación de moléculas (proteínas, isoenzimas, ácidos nucleicos) a través de una matriz tamponada (agarosa, acrilamida, almidón). La matriz funciona como un filtro, separando las moléculas en un campo eléctrico, de acuerdo al tamaño y la carga neta que poseen. En el caso de los ácidos nucleicos, el grupo fosfato es el responsable por la fuerte carga negativa en condiciones de pH neutro, haciendo que los fragmentos migren hacia el polo positivo (ánodo) durante la electroforesis (60).

La resolución y velocidad de separación de fragmentos de ADN por electroforesis son reguladas a través de la concentración de agarosa (o acrilamida) en el gel y el voltaje aplicado durante la electroforesis. La agarosa funciona como un filtro en el que los fragmentos de menor tamaño migran más rápidamente hacia el ánodo que aquellos de mayor tamaño. Al aumentar la concentración de agarosa se dificulta el movimiento de los fragmentos a lo largo del gel,

permitiendo obtener una mayor resolución en los fragmentos de menor longitud. El incremento del voltaje aumenta proporcionalmente la velocidad de migración de los fragmentos en el gel (60).

Sin embargo, aunque la electroforesis en gel es relativamente fácil de adoptar en cualquier laboratorio, que tiene una serie de desventajas, incluyendo mucha mano de obra en la preparación de geles de placa, y la exposición del usuario a productos químicos peligrosos, tales como el bromuro de etidio como agente de tinción. Por otra parte, los tiempos de separación pueden ser bastante largos, dependiendo de los parámetros experimentales, y geles planos en general no presentan la alta resolución requerida para satisfacer las demandas de investigación de hoy en día.

Con el desarrollo de la electroforesis capilar de alta resolución automatizada (Figura 13), se ha conseguido superar estos desafíos aumentando así la eficacia y la homogeneidad en la separación de ácidos nucleicos. Los cartuchos de gel de este sistema contienen 12 microcanales de separación, con una matriz de gel incorporado, que permite el análisis de muestras con muy poca interacción práctica, reduciendo así al mínimo la exposición a productos químicos peligrosos y la reducción de errores en la manipulación manual

Este sistema incluye un diseño novedoso de detección de fluorescencia multiplexada, que incluye una fuente de

iluminación por diodos que se adhieren a los capilares dentro de los cartuchos de gel. Fragmentos que migran a través de la matriz de gel pasan a través de unas ventanas de excitación y de detección, y las señales se leen mediante un ordenador y el programa de software adecuado (Figura 13(61)).

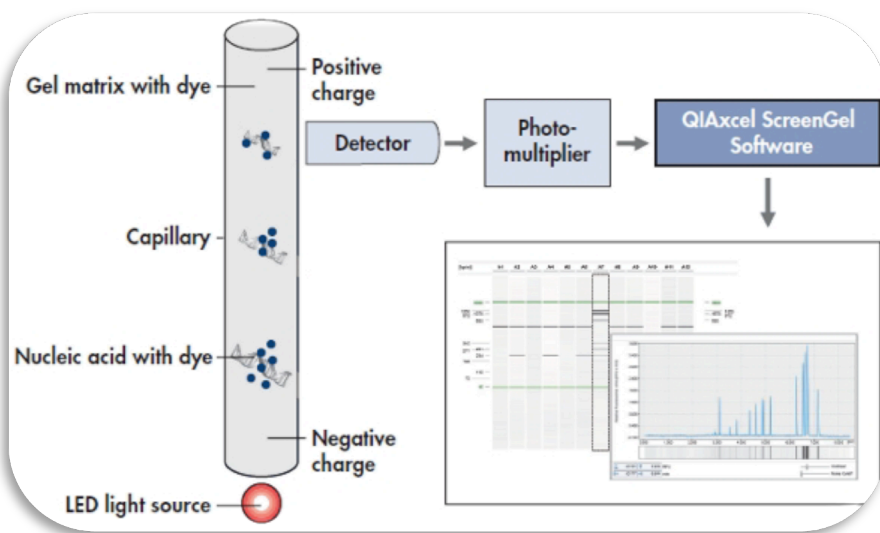


Figura 13.- Preparación de la muestra utilizando un sistema de electroforesis automática de alta resolución. Las moléculas de ácido nucleico son separadas por tamaño mediante la aplicación de una corriente eléctrica a un capilar relleno con gel. Mediante un detector del sistema las moléculas de ácido nucleico que migran hacia el terminal de carga positiva del capilar son detectadas. Estos datos pasan a través de un fotomultiplicador antes de ser convertidos a una imagen de electroferograma y gel por el software (Tomado de Schade C, 2013(61)).

En este estudio, la visualización de los productos de PCR se llevó a cabo mediante electroforesis capilar automática de alta resolución (QIAxcel System, Qiagen, Hilden, Alemania), una, usando el kit high QIAxcel DNA High Resolution. El tamaño del fragmento del producto amplificado por PCR fue

identificado en comparación con los fragmentos de PCR del control positivo (18S).

El marcador QX DNA Size Marker (Qiagen) con un rango de 8 tamaños de fragmentos de 50 bp a 1,5 kb fue utilizado para medir los productos de PCR. El marcador de alineamiento QX Alignment Marker (Qiagen), que consiste en fragmentos de 15-bp y 5-kb, fue inyectado en el cartucho de cada muestra. El método DM190 del software BioCalculator® (Qiagen) fue utilizado para su análisis; el cual se corresponde con una inyección de la muestra de 15 s a 10 kV, y 360 s de tiempo de separación a 10 kV. El sistema QIAxcel realizó la inyección electrocinética de las moléculas de ADN de los productos de PCR para su análisis. El tiempo de retención de los fragmentos de PCR relativo a marcador de alineamiento de 15-bp y 5-kb fue calculado utilizando el software BioCalculator. De esta forma, el tamaño de los productos de PCR fue determinado por comparación del tiempo de retención con el marcador QX DNA Size Marker. El software BioCalculator produjo la imagen digital y el electroferograma del análisis de los fragmentos.

9.7.5 PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR). Expresión génica de GAPDH y VEGF

Dado que la PCR estándar no es una técnica cuantitativa, la metodología de la TaqMan PCR fue utilizada para el análisis de expresión génica de la GAPDH, tanto en los estudios

previos de selección del ACP y T^a como en los estudios “in vivo”, y para el análisis de expresión génica del VEGF en los estudios “in vivo” para analizar el grado de revascularización de los injertos de TA.

La metodología de RT-qPCR, a diferencia de la PCR competitiva, permite la automatización y además es rápida y no necesita el procesamiento posterior del producto de PCR, lo que reduce el riesgo de contaminación.

La RT-qPCR es una variación de la PCR estándar utilizada para la cuantificación de ADN o de ARNm de una muestra. Es posible determinar el número de copias o la cantidad relativa de una determinada secuencia de ADN o ARN utilizando cebadores específicos de secuencia. Cuando la PCR a tiempo real se combina con una reacción previa de retro-transcripción, puede determinarse la cantidad de ARNm de una muestra mediante una cuantificación relativa. Se dice que es una cuantificación relativa porque se compara entre las diferentes muestras la expresión del gen objeto de estudio respecto a la expresión de un gen constitutivo (control endógeno). Es lo que se denomina como normalización de la expresión del gen específico. Los genes más utilizados como controles endógenos son: ARNr 18S, GAPDH, beta-actina, TBP, HPRT, beta-2- microglobulina, entre otros.

La cuantificación del producto se produce mediante la adición de fluoróforos que se unen al amplicón de forma cuantitativa,

a mayor producto se emitirá mayor fluorescencia. Los sistemas de RT-qPCR detectan la cantidad de fluorescencia producida en cada ciclo de RT-qPCR y los softwares de análisis representan dicha fluorescencia gráficamente respecto al número de ciclos. La cantidad de amplicón producido es proporcional al número de moléculas de ARN/ADN iniciales, de forma que en aquellas muestras con mayor expresión del gen, el amplicón fluorescente aparecerá en ciclos anteriores.

Desde el punto de vista técnico, existen dos principales métodos de análisis de PCR cuantitativa que se basan en técnicas de fluorescencia que se diferencian en la metodología de detección de los productos de RT-qPCR. Estos métodos son:

- *Sondas TaqMan*: basados en el uso de dos sondas que hibridan en las secuencias específicas.
- *SYBR Green I*: utiliza este fluorocromo intercalante que se une a la doble cadena de ADN inespecíficamente.

El método más difundido, y el utilizado es nuestro experimento, es el que emplea sondas TaqMan (62) que garantiza la obtención de ensayos de PCR altamente específicos, con una eficiencia de amplificación cercana al 100% que además permite evaluar numéricamente con la más alta precisión, la cantidad de moléculas de material genético presente en cada muestra. Estas propiedades

específicas permiten la aplicación de RT-qPCR en la cuantificación absoluta y relativa de genes sin necesidad de purificar una muestra de ARN total o requerir de una gran cantidad de la misma. Esta metodología se basa en la actividad 5'-exonucleasa de la Taq polimerasa y en la amplificación mediante RT-qPCR de una determinada secuencia diana en presencia de una sonda fluorescente específica (sonda TaqMan) que hibrida con la secuencia diana que estamos amplificando (Figura 14).

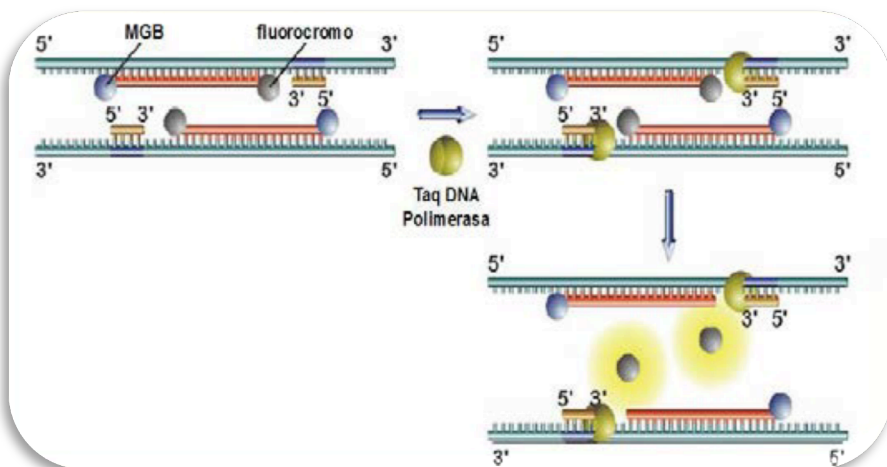


Figura 14.- RT-qPCR con tecnología TaqMan. Fundamentos de la estrategia empleando sondas TaqMan. Actividad 5' exonucleasa de la Taq polimerasa (Tomada de Novella-Maestre E, *Acción antiangiogénica de los agonistas dopaminérgicos en lesiones endometriósicas*. Universidad de Valencia, 2008 (53)).

La sonda TaqMan tiene unido un fluorocromo en posición 5' y un amortiguador de fluorescencia en posición 3' (MGB: *minor groove binder*) que se une al surco menor del ADN protegiendo a la sonda de la actividad exonucleasa de la enzima Taq polimerasa (Figura 15).

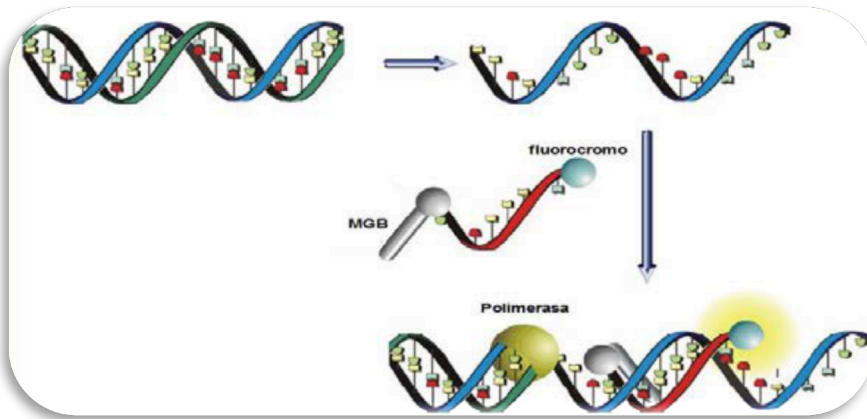


Figura 15.- RT-qPCR con tecnología TaqMan. Mecanismo de acción del amortiguador de fluorescencia (MGB) en las sondas TaqMan (Tomada de Novella-Maestre E, Acción antiangiogénica de los agonistas dopaminérgicos en lesiones endometriósicas. Universidad de Valencia, 2008 (53)).

Además, esta sonda está fosforilada en el extremo 3' para evitar su extensión durante la reacción de PCR. Si la secuencia diana está presente en la muestra, la sonda TaqMan hibridará específicamente con ella, situándose entre los dos cebadores. Cuando se produce la etapa de extensión en la reacción de PCR, la actividad 5'-exonucleasa de la Taq polimerasa degradaría la sonda TaqMan liberando el fluorocromo, que al estar fuera de la influencia del amortiguador emitirá una señal que puede ser captada por el sistema óptico del equipo. Este proceso de degradación de la sonda tiene lugar en cada ciclo y no interfiere con la acumulación del producto de la RT-qPCR, por lo que se produce un incremento exponencial de la señal de fluorescencia en cada ciclo de la reacción de RT-qPCR. Otra de las ventajas es que la enzima Taq polimerasa no digiere la

sonda libre sino únicamente la hibridada, por lo que la cantidad de señal fluorescente emitida es proporcional a la cantidad de producto acumulado. La medición de la intensidad de fluorescencia se realiza de forma continua, lo que nos proporciona una información dinámica en tiempo real (análisis cinético) del proceso. De esta forma podemos establecer el ciclo umbral (*Ct-cycle threshold*), es decir, el número de ciclos necesarios para que la cantidad de producto producido alcance el nivel de detección que hayamos fijado, lo que a su vez se correlaciona directamente con la cantidad de ADNc de la secuencia diana (Figura 16).

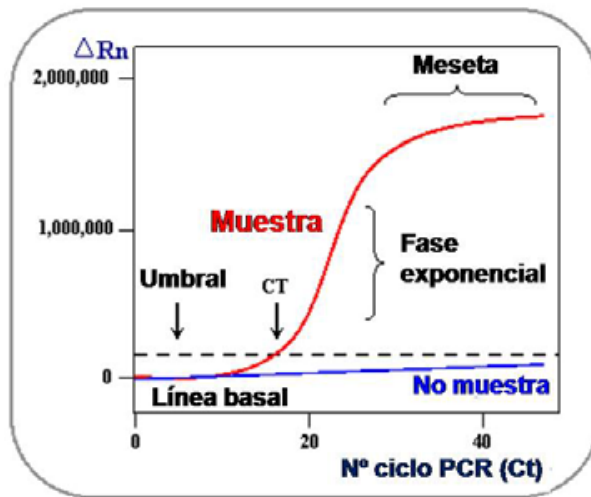


Figura 16.- Modelo de RT-qPCR. Se representa el nº de ciclo de la PCR (Ct) respecto al producto de PCR (ΔRn) de una muestra (línea roja) y de control negativo (línea azul). En la representación de la muestra, se observa el patrón típico esperado, en el que en los primeros ciclos de la PCR no hay producto, posteriormente presenta una fase exponencial llegando a alcanzar una meseta (Imagen modificada de <http://www.rt-pcr.com>).

El método utilizado para calcular la expresión relativa de un

gen es el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (63). Este método consiste en relativizar la expresión del gen en la muestra problema respecto a la muestra control, normalizando ambas con la expresión de un gen constitutivo. Para ello se sigue el siguiente procedimiento:

- Cálculo del valor de ΔCt : consiste en normalizar el valor de Ct de cada muestra respecto al control endógeno.

$$\Delta Ct = Ct_{\text{gen}} - Ct_{\text{control endógeno}}$$

- Cálculo de $\Delta\Delta Ct$: se normaliza respecto a la muestra control o calibrador.

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{muestra problema}} - \Delta Ct_{\text{muestra control}}$$

- Cálculo de la expresión relativa ("Fold change"): representa cuántas veces más o cuántas veces menos se expresa el gen problema en la muestra bajo estudio respecto a la muestra control, relativizado a la expresión basal de un gen constitutivo. La muestra control tendrá un valor de 1, mientras que las muestras problema presentarán un valor mayor o menor de 1 dependiendo si la expresión del gen es mayor o menor respectivamente.

$$\text{Expresión relativa} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Debido a todas estas características, la metodología de la TaqMan PCR fue utilizada para el análisis de expresión

génica de la GAPDH y VEGF. El empleo de sondas TaqMan garantiza la obtención de ensayos de PCR altamente específicos, de una eficiencia de amplificación cercana al 100% que además permite evaluar numéricamente con la más alta precisión, la cantidad de moléculas de material genético presente en cada muestra. El desarrollo de la técnica y la normalización y cuantificación de los resultados se llevará a cabo tal y como se ha descrito previamente (40,64,65) y que detallamos a continuación.

Los experimentos de RT-qPCR se realizaron con el sistema ABI PRISMTM 7900 Sequence Detection (Life Technologies) previa extracción de ARN y conversión a ADNc mediante transcripción reversa de los ARNm extraídos. Los cebadores utilizados y los correspondientes controles se detallan en la tabla 4. Como fluorocromo de unión a ADN de doble cadena se usó FAM (carboxi-fluoresceína) cuya absorbancia es de 535 a 495 nm. Para cada 10 μ l de reacción TaqMan, se mezclaron 1 μ l de ADNc, 3,5 μ l de agua destilada libre de ARN, 5 μ l de TaqMan Universal PCR Master Mix (PE Life Technologies) and 0,5 μ l 20x "Assay on Demand" que contenían la sonda y los cebadores específicos para cada gen. Cada ensayo se llevó a cabo por triplicado. Las condiciones de RT-qPCR fueron las siguientes: 2 min a 50°C seguido de 10 min a 95°C para la activación enzimática, posteriormente ocurren 45 ciclos de dos pasos de 15 s a 95°C y 1 min a 60°C. Los productos finales se analizaron con el software específico de sistema de detección de secuencias

7900HT versión 2.4 (PE Life Technologies). Los datos se representaron mediante el valor medio relativo del gen analizado y normalizado con respecto al valor correspondiente del gen de la subunidad 18S del ARN ribosómico utilizando el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (63,66).

Gen	Referencia secuencia
18S	Hs99999901_s1
GAPDH	Hs02758991_g1
VEGFA	Hs00900055_m1

Tabla 4.- “Primers” utilizados en el estudio molecular por TaqMan-PCR para cada uno de los genes analizados.

9.8 Análisis estadístico

El análisis estadístico se llevó a cabo mediante el soporte informático GraphPad InStat V3.0 (GraphPad Software, San Diego, California, Estados Unidos).

Se calculó media, desviación estándar (DE) y error estándar de la media (SEM). La media se expresa como media \pm DE. Tras aplicar el test estadístico de Kruskal-Wallis, se utilizó el test no paramétrico de Mann-Whitney para comparar los valores del grupo control con los grupos experimentales. El test de comparaciones múltiples de Dunn fue aplicado como post-test y en el caso de estudios de correlación se aplicó el coeficiente de correlación de Spearman-Brown.

Se consideró estadísticamente significativa una $p < 0,05$ y muy significativa una $p < 0,001$.

:: RESULTADOS

10 RESULTADOS

10.1 Características de los pacientes incluidos

El número total de pacientes incluidos en este estudio fue de 10. El TA procedente de 4 pacientes fue destinado al estudio inicial para la selección de T^a y ACP de criopreservación, mientras que el TA de los 6 pacientes restantes fue destinado al estudio “in vivo”.

De los pacientes donantes incluidos, 9 fueron mujeres, 1 paciente fue hombre; la media de edad fue 40,50 años +/- 11,97 DE; la media de peso fueron 65,85 kg +/- 8,34, y la altura 164,1 cm +/- 5,43. El IMC medio fue de 24,45 kg/m² +/- 2,73. En el 60% de los pacientes, la zona donante fue el abdomen, en el 20% de ellos los flancos, y en un 10% tanto para glúteos como para trocánteres (Tabla 5).

	Sexo	Edad (Años)	Peso (Kg.)	Altura (cm.)	IMC (kg/m ²)	Enfermedades	Zona donante
Paciente 1	Mujer	40	68	168	24,09	No	Abdomen
Paciente 2	Mujer	34	56	160	21,87	Epilepsia, fallo ovárico precoz	Trocánteres
Paciente 3	Mujer	24	66	161	25,46	No	Glúteos
Paciente 4	Mujer	45	72,5	163	27,29	Tiroiditis de Hashimoto	Flancos
Paciente 5	Mujer	45	59	159	23,34	No	Abdomen
Paciente 6	Mujer	30	64	175	20,9	No	Abdomen
Paciente 7	Mujer	55	65	158	26,04	Asma, osteoporosis	Abdomen
Paciente 8	Hombre	44	85	170	29,41	No	Abdomen
Paciente 9	Mujer	61	65	162	24,77	HTA	Abdomen
Paciente 10	Mujer	27	58	165	21,3	DM tipo I	Flancos
Media ± DE	-----	40,5 ± 11,97	65,85 ± 8,34	164,1 ± 5,43	24,45 ± 2,73	-----	-----

Tabla 5.- Datos generales de las pacientes donantes del tejido adiposo.

10.2 Estudio estructural del TA criopreservado con Trehalosa y HES a distintas T^a de congelación

En el estudio histológico se evaluó las características morfológicas y estructurales del TA criopreservado a diferentes T^a y ACPs que fueron comparadas con las del TA fresco (Figura 17).

Las muestras de TA criopreservado a -20°C con HES (Grupo 1) (Figura 18) o Trehalosa (Grupo 3) (Figura 19) presentaron una arquitectura histológica similar a la del TA fresco (Figura 20) con adipocitos bien conformados contenidos en la matriz extracelular situándose los núcleos en la periferia; no se observaron tampoco diferencias estructurales según el ACP utilizado.

Las muestras de TA criopreservado a -80°C con HES (Grupo 2) (Figura 21) o Trehalosa (Grupo 4) (Figura 22) tampoco presentaron alteraciones a nivel tisular entre ellas, observándose una morfología similar a las muestras criopreservadas a -20°C y a la del TA fresco (grupo control) independientemente del ACP utilizado.

Por lo tanto, todas las muestras criopreservadas a -20°C y -80°C, con HES o Trehalosa mostraron una buena conservación estructural equiparable a la presentada por el TA obtenido y procesado en fresco.

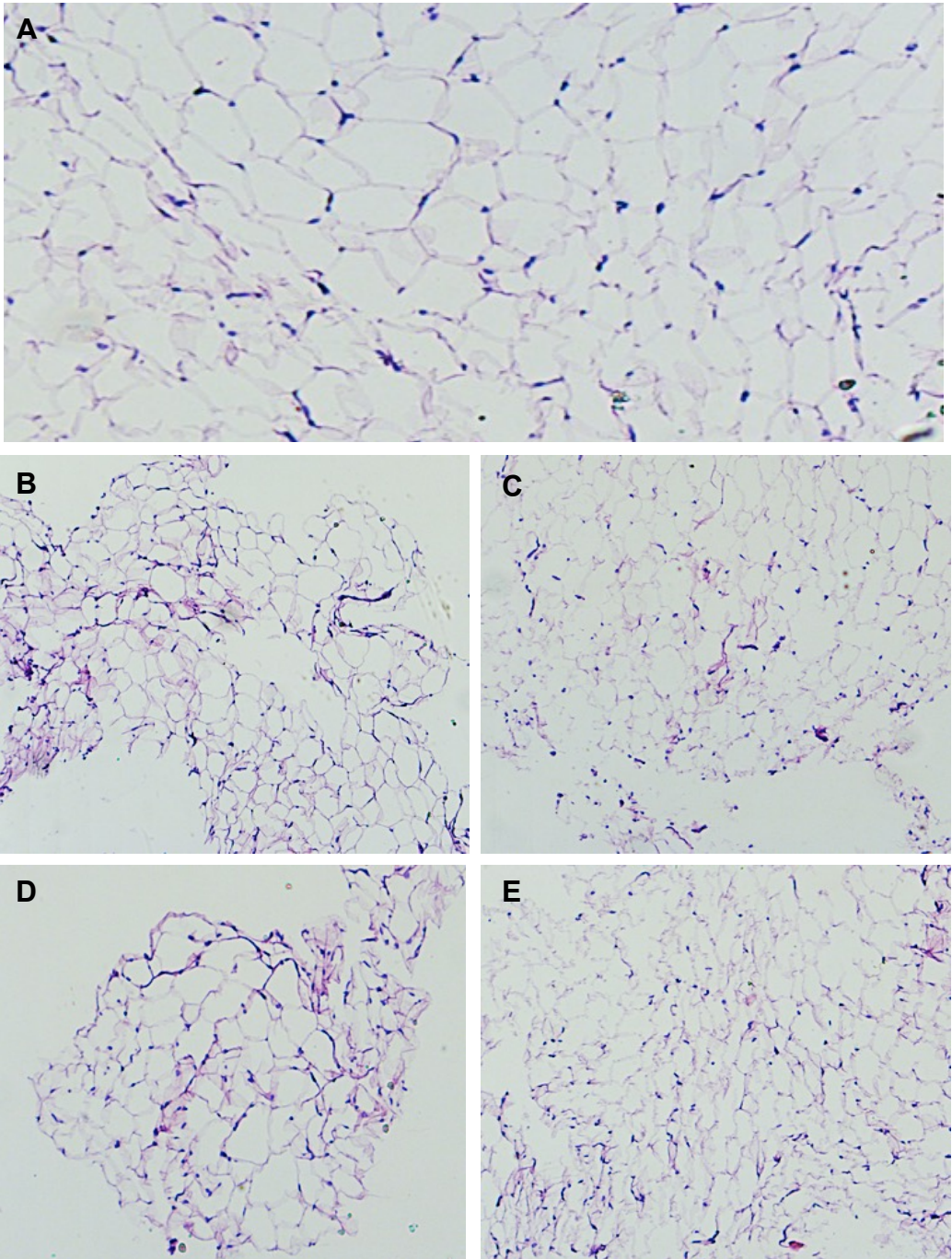


Figura 17.- Estudio histológico del TA criopreservado. Grupo control: TA fresco, 10x (A). Grupo 1: TA criopreservado con HES a -20°C , 5x (B). Grupo 2: TA criopreservado con HES a -80°C , 5x (C). Grupo 3: TA criopreservado con trehalosa a -20°C , 5x (D). Grupo 4: TA criopreservado con trehalosa a -80°C , 5x (E).

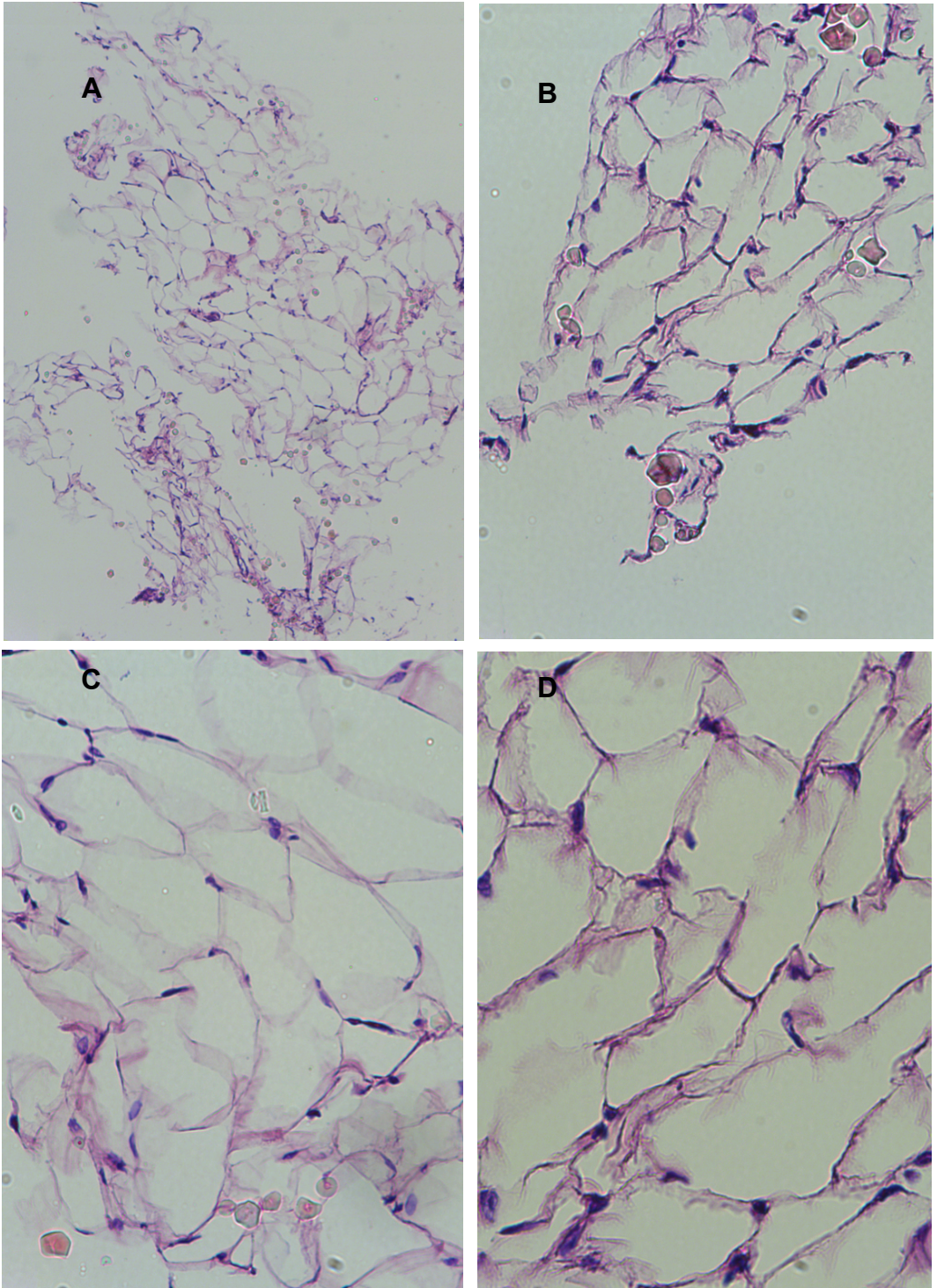


Figura 18.- Estudio histológico del TA criopreservado con HES a -20°C de T^{a} . 5x (A), 10x (B), 20x (C) y 40x (D).

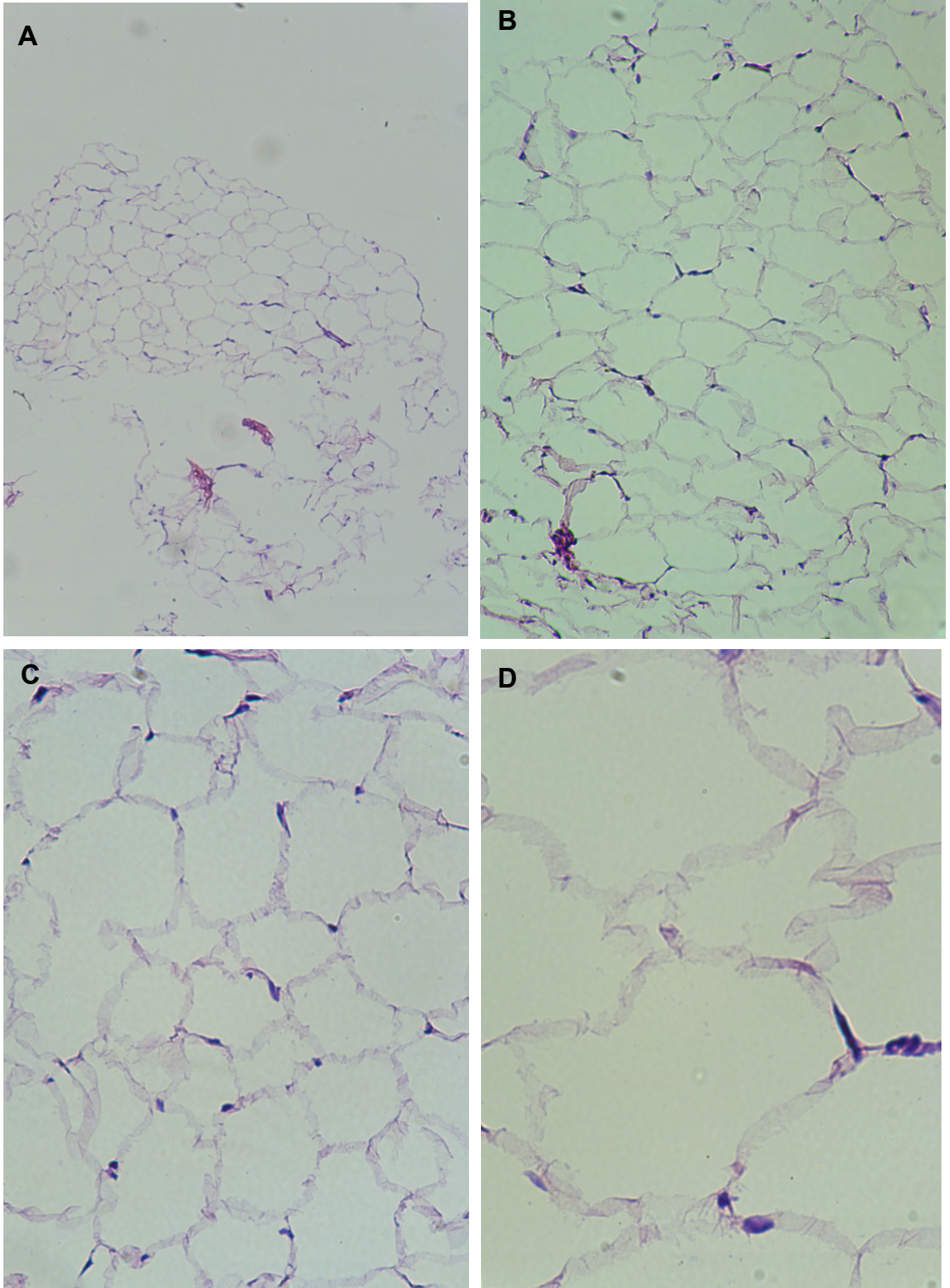


Figura 19.- Estudio histológico del TA criopreservado con trehalosa a -20°C de T^a. 5x (A), 10x (B), 20x (C) y 40x (D).

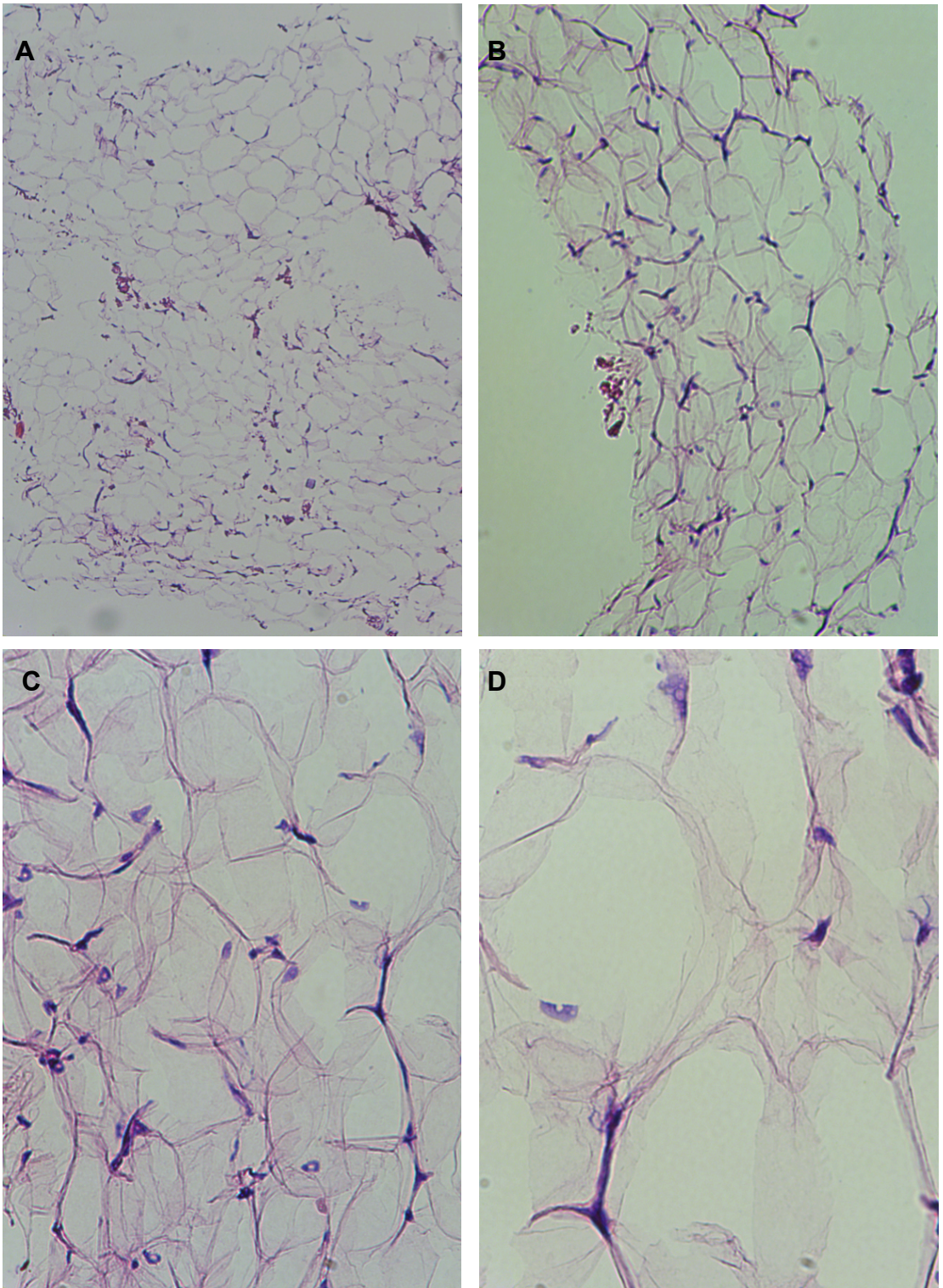


Figura 20.- Estudio histológico del TA fresco . 5x (A), 10x (B), 20x (C) y 40x (D).

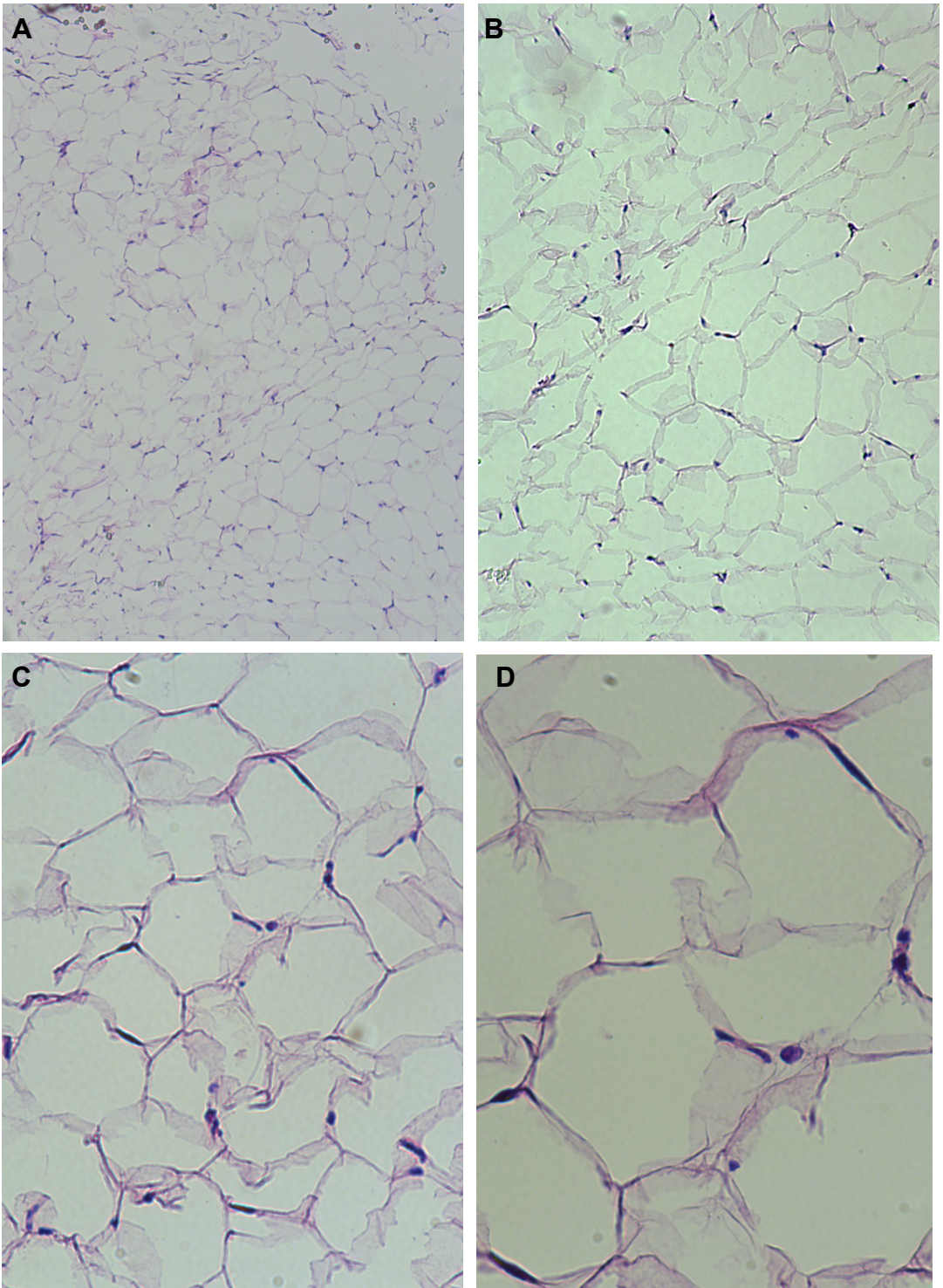


Figura 21.- Estudio histológico del TA criopreservado con HES a -80°C de T^a. 5x (A), 10x (B), 20x (C) y 40x (D).

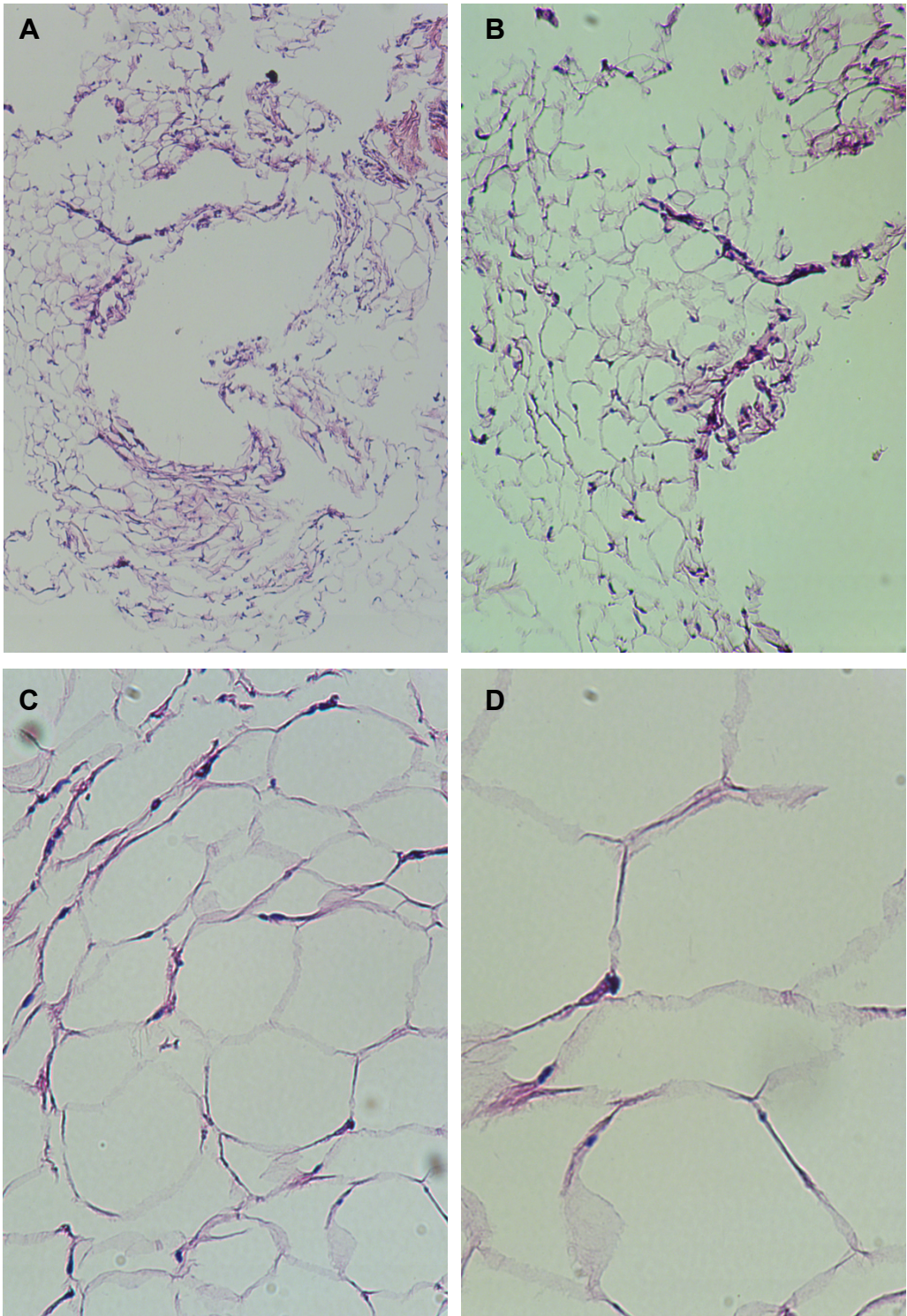


Figura 22.- Estudio histológico del TA criopreservado con trehalosa a -80°C de T³. 5x (A), 10x (B), 20x (C) y 40x (D).

10.3 Estudio de viabilidad del TA criopreservado con Trehalosa y HES a distinta Tª de congelación

En el estudio inicial se compararon diferentes grupos de TA criopreservados con Trehalosa o HES a -20°C o -80°C . Para evaluar la viabilidad tisular tras el uso de los diferentes ACPs en las diferentes condiciones de criopreservación, se llevó a cabo un análisis de los niveles de expresión del gen GAPDH mediante PCR estándar (Figura 23A) y TaqMan-PCR (Figura 23B).

Se obtuvo expresión de GAPDH en todos los grupos, para evaluar la viabilidad de TA. Todas las muestras analizadas y procesadas mediante las diferentes condiciones experimentales utilizadas presentaron expresión de GAPDH, indicando de esta forma la viabilidad tisular tras la criopreservación.

El TA criopreservado a -20° con trehalosa (Grupo 3) presentó una banda de GAPDH ligeramente más tenue que el resto de los grupos mediante el análisis por PCR (Figura 23A). Cuando se llevó a cabo el estudio cuantitativo de la expresión de GAPDH mediante TaqMan PCR observamos que no había diferencias estadísticamente significativas de los distintos grupos experimentales ($p>0,05$) (Grupo 1: $7,02\pm 2,33$; Grupo 2: $9,02\pm 2,70$; Grupo 3: $4,64\pm 0,91$; Grupo 4: $6,31\pm 0,65$; frente al grupo control $4,72\pm 0,13$) (Figura 23B). Un dato interesante es que la expresión de GAPDH fue mayor en el grupo 1, 2 y 4 que en el grupo control, con lo

cual la adición de ACP no sólo mantiene la viabilidad del TA sino que podría incluso mejorarla, al menos en condiciones experimentales.

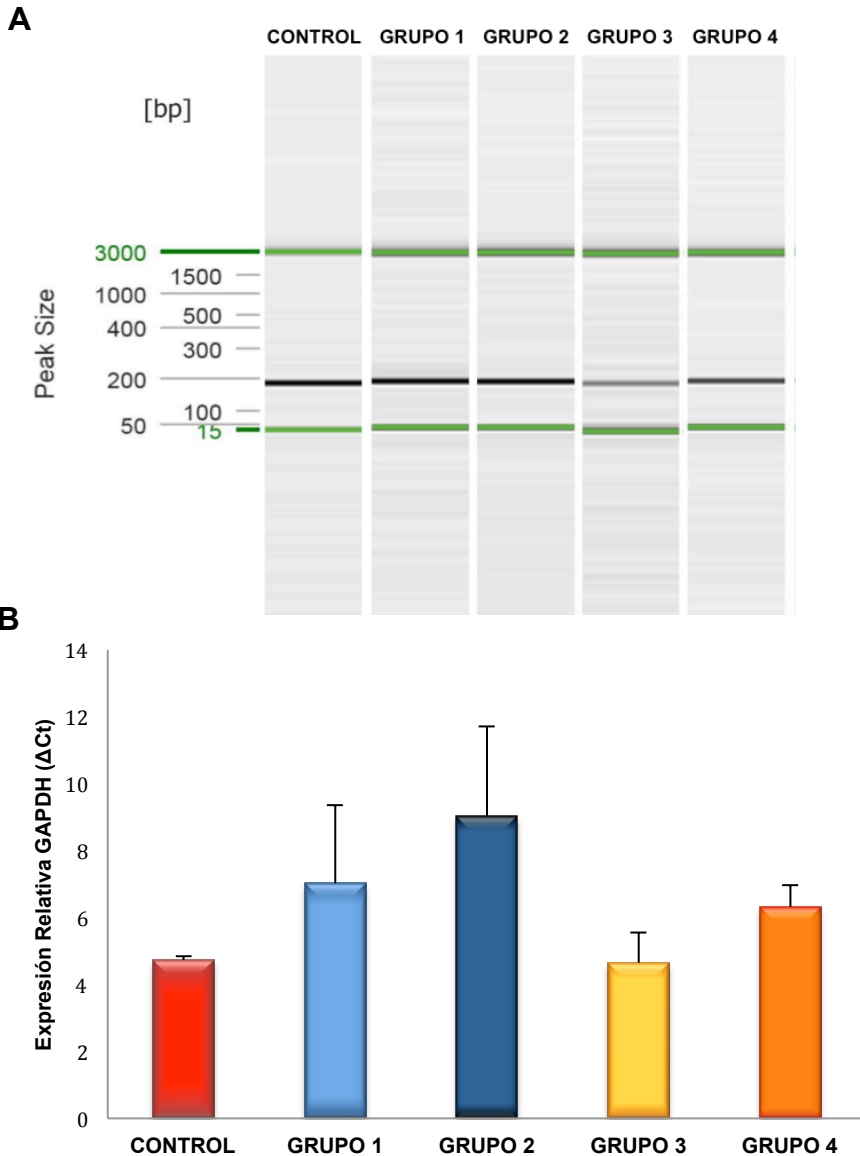


Figura 23.- Estudio de viabilidad mediante la cuantificación de expresión génica relativa de GAPDH. Resultados del análisis por PCR en gel de agarosa (A). Resultados del análisis cuantitativo por TaqMan PCR (media \pm DE) (B).

10.4 Estudios de TA criopreservado en el modelo animal

En el estudio inicial se demostró que no existían diferencias significativas a nivel histológico ni tampoco en la expresión del GAPDH al criopreservar a una Tª de -20° frente a -80°, bien usando HES o trehalosa, ya que en todos los casos se mantenían tasas de expresión y características morfológicas muy similares al tejido en fresco. Es por ello que para el estudio “in vivo” sólo estudiamos los protocolos de criopreservación mediante HES y trehalosa a -20°, al ser una Tª más accesible y aplicable al contexto clínico en un futuro.

10.4.1 Estudio macroscópico de los implantes

La tasa de recuperación de los implantes de TA tras 1 mes de implantación fue del 100% en todos los grupos experimentales.

No se observaron quistes oleosos ni necrosis grasa a nivel macroscópico en ninguno de los implantes de TA.

Todos los animales presentaban injertos grasos de buen aspecto en los que se observaba una fina red capilar que aportaba los nutrientes necesarios para la supervivencia del implante, lo cual indicaba un adecuado prendimiento del TA (Figura 24).

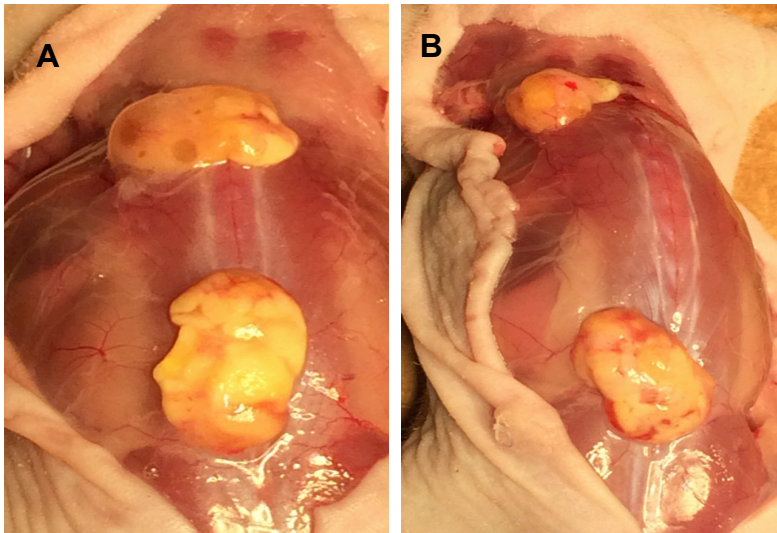


Figura 24.– Injertos de TA recuperados tras 1 mes de implantación. (A) Muestras de TA criopreservadas con HES durante 2 meses (Grupo B). (B) Muestras de TA criopreservadas con trehalosa durante 1 mes (Grupo C). Obsérvese la fina red capilar que envuelve los implantes.

10.4.2 Caracterización de los injertos. Tasa de prendimiento del injerto de TA en modelo animal

Cada una de las muestras de TA criopreservadas fueron caracterizadas mediante peso y volumen, analizándose dichos parámetros en el momento previo a la implantación y tras la recuperación de los implantes (tabla 6).

Grupo	Peso (gr.)		Volumen (ml.)	
	Pre-implantación	Post-implantación	Pre-implantación	Post-implantación
Control	0,48±0,1	0,16±0,03*	0,45±0,08	0,18±0,06*
A	0,39±0,09	0,07±0,02*	0,38±0,05	0,1±0,01*
B	0,40±0,04	0,13±0,05*	0,38±0,03	0,19±0,08*
C	0,5±0,03	0,1±0,04*	0,48±0,04	0,13±0,04*
D	0,49±0,03	0,13±0,08*	0,49±0,05	0,16±0,08*

Tabla 6.- Valores del peso y volumen de los injertos de TA pre y post-implantación .
 Datos expresados como media±DE * P<0,05

Se observó una disminución estadísticamente significativa ($p < 0,05$) en el peso y volumen en todos los grupos experimentales cuando se compararon ambos valores en el momento del implante y tras su recuperación.

No se observaron diferencias estadísticamente significativas en volumen o peso de los implantes de TA entre los diferentes grupos experimentales antes de su implantación o tras su recuperación.

La tasa de prendimiento de cada uno de los injertos, expresada como el porcentaje de peso mantenido en cada una de las muestras, fue de $33,77 \pm 9,63\%$ en el Grupo control, $18,88 \pm 5,41\%$ en el Grupo A (HES criopreservado 1 mes, -20°C), $32,17 \pm 14,19\%$ en el Grupo B (HES criopreservado 2 meses, -20°C), $22,10 \pm 9,83\%$; en el Grupo C (trehalosa criopreservado 1 mes, -20°C) y de $26,09 \pm 15,40\%$ en el Grupo D (trehalosa criopreservado 2 meses, -20°C) (Figura 25).

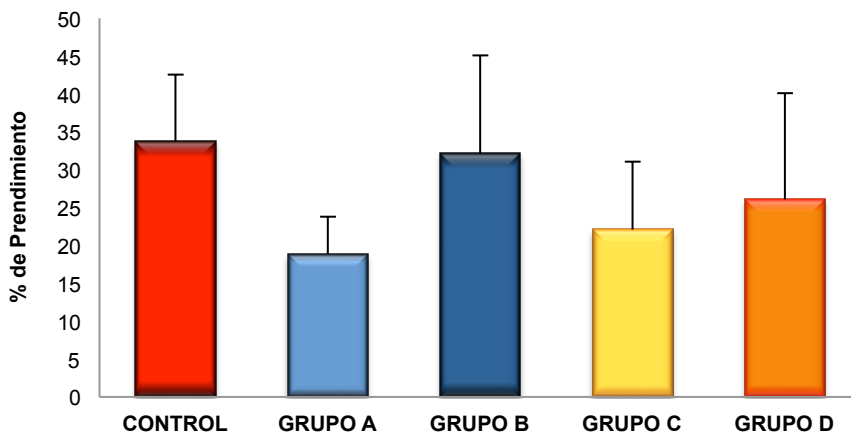


Figura 25.– Tasas de prendimiento del TA en distintos grupos experimentales. Comparación de la tasa de prendimiento en el estudio in vivo entre los diferentes grupos experimentales y el grupo control. Datos expresados como media ± DE.

Al comparar según el tiempo de criopreservación los grupos criopreservados con un mismo ACP, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) en la tasa de prendimiento entre los grupos de TA criopreservado con el HES durante 1 o 2 meses en comparación con el Grupo control (% de prendimiento: Grupo control: $33,77 \pm 9,63$; Grupo A: $18,88 \pm 5,41$; Grupo B: $32,17 \pm 14,19$) (Figura 26A), ni entre los grupos de TA criopreservado con trehalosa durante 1 o 2 meses en comparación con el Grupo control (% de prendimiento: Grupo control: $33,77 \pm 9,63$; Grupo C: $22,10 \pm 9,83$; Grupo D: $26,09 \pm 15,40$) (Figura 26B).

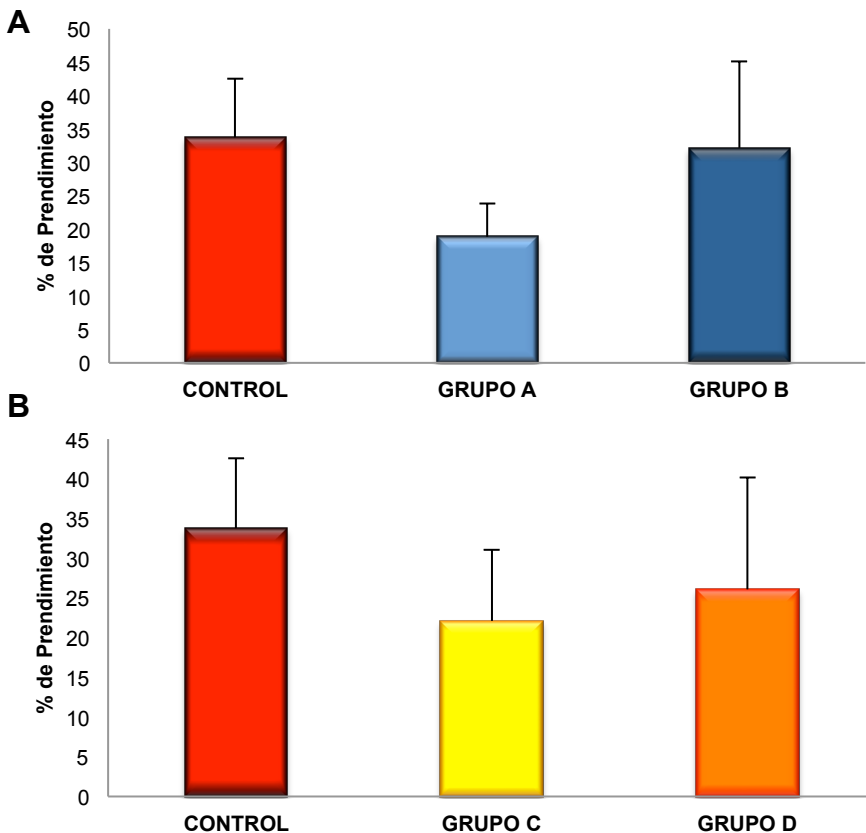


Figura 26.- Comparación de la tasa de prendimiento del TA según tiempo de criopreservación. Implantes de TA criopreservado con HES durante 1 y 2 meses (A). Implantes de TA criopreservado con trehalosa durante 1 y 2 meses (B).

Datos expresados como media ± DE.

Asimismo, al comparar los grupos según el ACP (con el mismo tiempo de criopreservación), tampoco se encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los implantes de TA criopreservado con HES y trehalosa durante 1 mes o comparados con el Grupo control (Figura 27A) o entre los implantes de TA criopreservado con HES y trehalosa durante 2 meses o comparados con el Grupo control (Figura 27B).

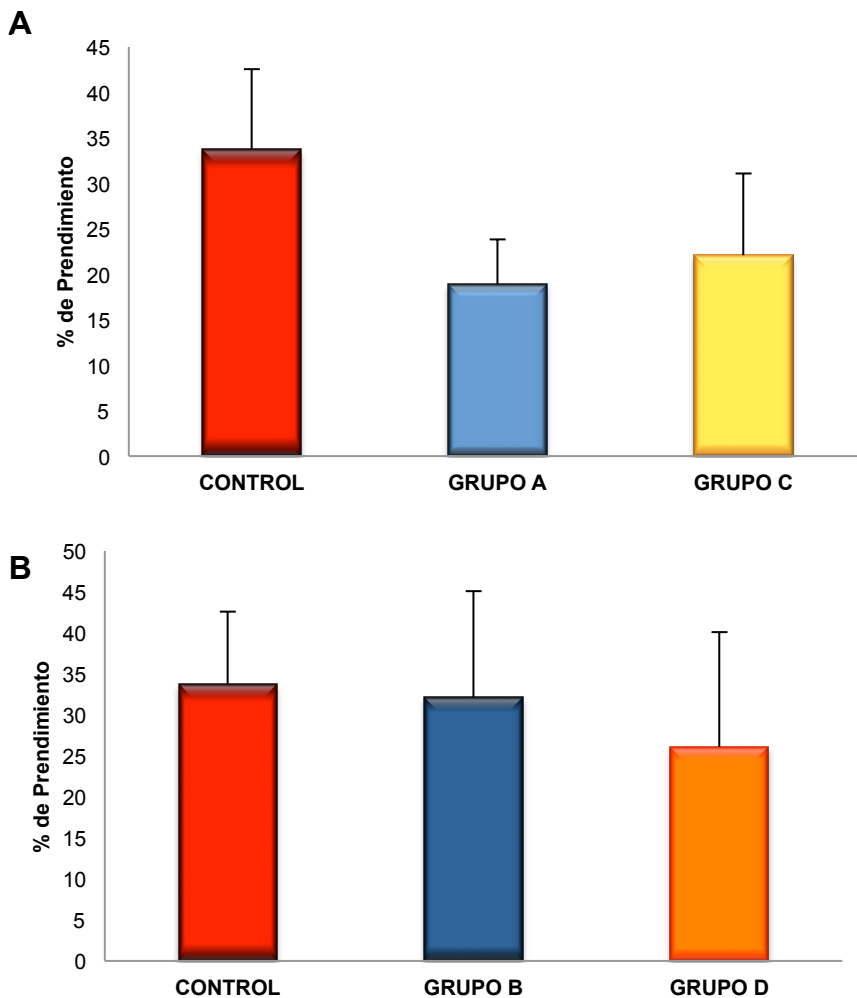


Figura 27.- Comparación de la tasa de prendimiento del TA según el ACP utilizado. Implantes de TA criopreservado con HES y trehalosa durante 1 mes (A). Implantes de TA criopreservado con HES y trehalosa durante dos meses (B). Datos expresados como $\text{media} \pm \text{DE}$.

10.5 Estudio estructural del TA criopreservado e implantado en modelo animal

El estudio histológico del TA criopreservado en general demostró una buena conformación y signos de vascularización en los implantes, tras un mes de implantación en los animales de experimentación. Estas características estructurales fueron comunes y muy similares tanto en los implantes de los grupos experimentales como en los implantes de TA fresco (Grupo control) (Figura 28).

Analizando la histología del TA fresco (Grupo control) se observan lóbulos adiposos bien delimitados por tejido fibroso y celularidad normoconformada. Se pueden distinguir finos tabiques que corresponden a los rodetes citoplasmáticos de los adipocitos que en algún punto se engrosan para albergar el núcleo (Figura 29A).

En la zona central observamos tejido conjuntivo de refuerzo densamente celular con evidente vascularización (Figura 29B). Estos hallazgos histológicos indican claramente el óptimo prendimiento del implante de TA fresco (grupo control).

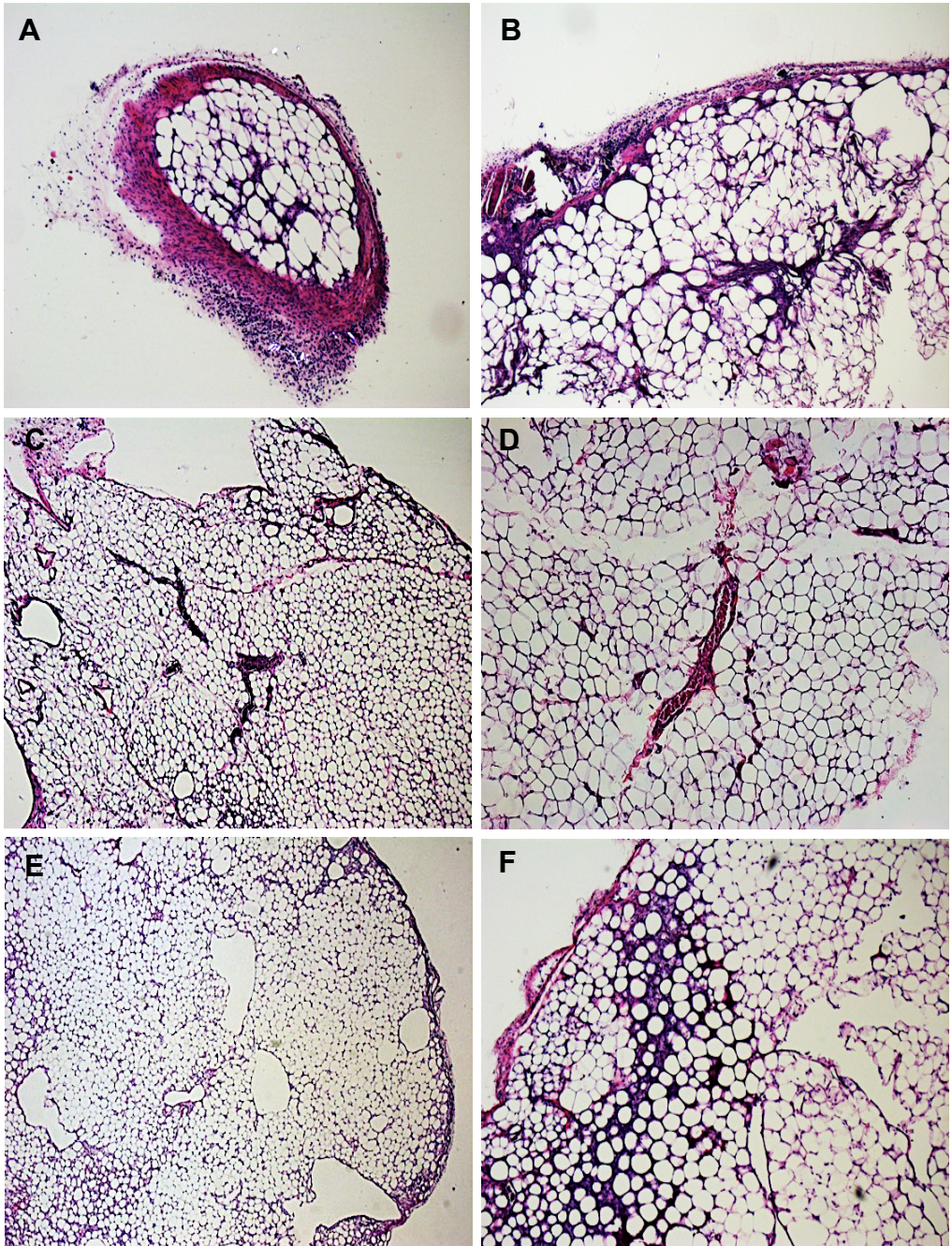
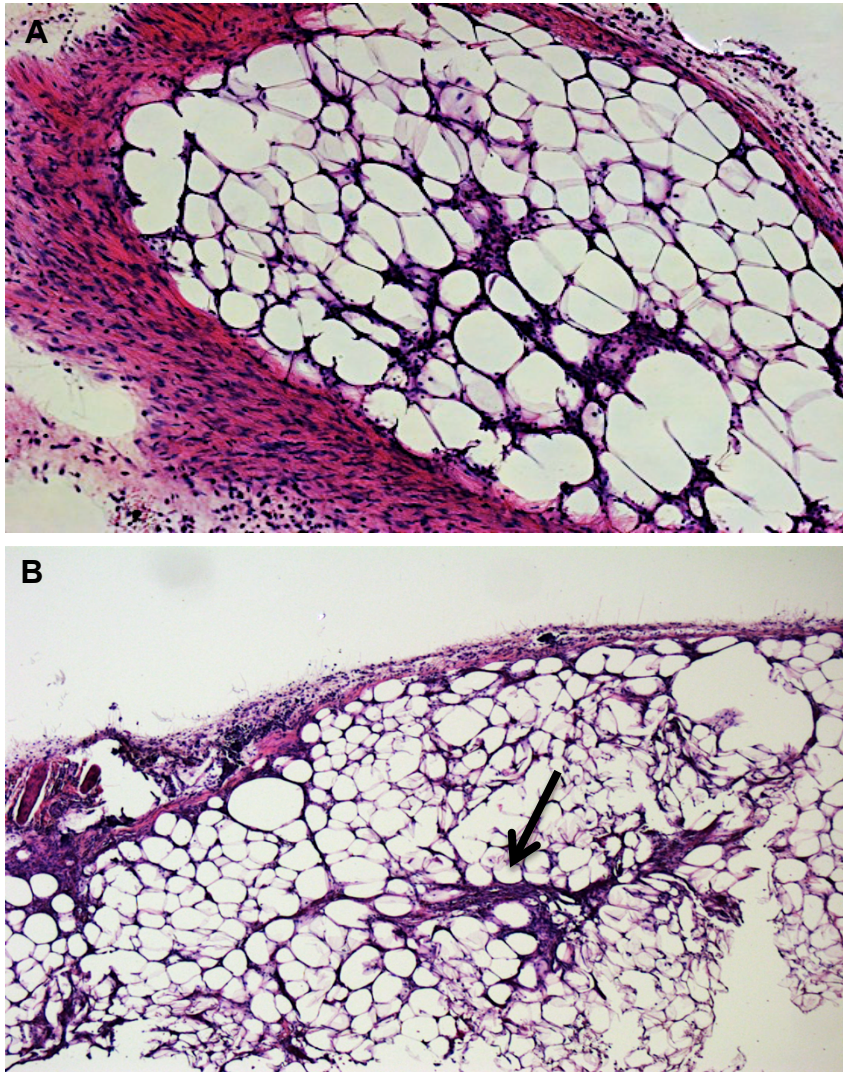


Figura 28.- Análisis histológico de los implantes de TA en modelo animal. Implante de TA fresco (A: 5x; B: 10x); criopreservado 1 mes con HES (C: 5x); criopreservado 1 mes con trehalosa (D: 10x); criopreservado 2 meses con HES (E: 5x); y criopreservado 2 meses con trehalosa (F: 10x).



**Figura 29.- Implante de TA del Grupo control. TA fresco (A: 40x).
Obsérvese el tejido conjuntivo de refuerzo (B: flecha, 20x).**

A continuación estudiamos la estructura del TA previamente criopreservado durante 1 mes a -20°C , bien con HES (Figura 30A) o Trehalosa (Figura 30B). En ambos casos observamos una conservación adecuada en cuanto a conformación y celularidad, y que al igual que los implantes del grupo control

en fresco, el TA estaba ricamente invadido por vasos y nervios indicando así el prendimiento óptimo del implante.

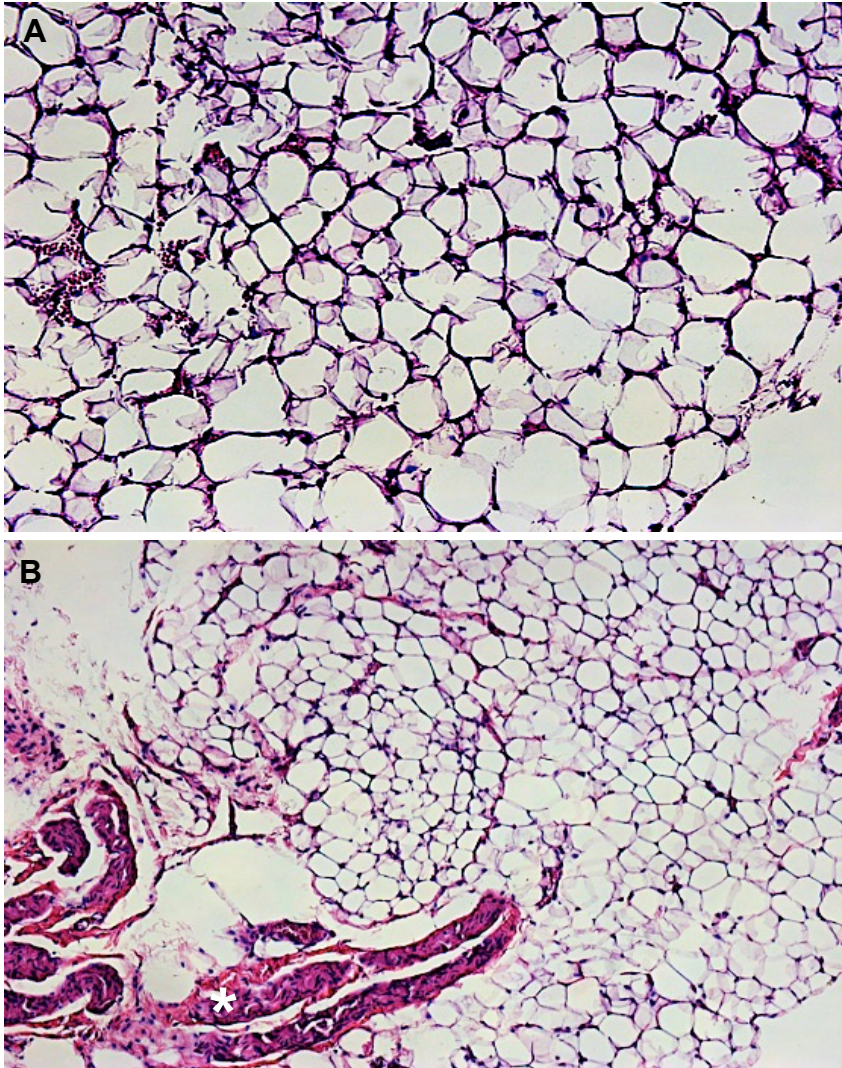


Figura 30.- Implante de TA previamente criopreservado durante 1 mes. TA criopreservado con HES (A: 40x, grupo A) y con trehalosa en la que se observa invasión vascular y de fibras nerviosas (*) (B: 20x, grupo C).

Por último en cuanto al análisis a nivel histológico el TA criopreservado durante 2 meses mediante los 2 protocolos descritos (Figura 31), observamos exactamente los mismos hallazgos en cuanto a conformación, celularidad, y vascularización, etc. que encontramos en el tejido criopreservado durante 1 mes y en el grupo control (TA fresco).

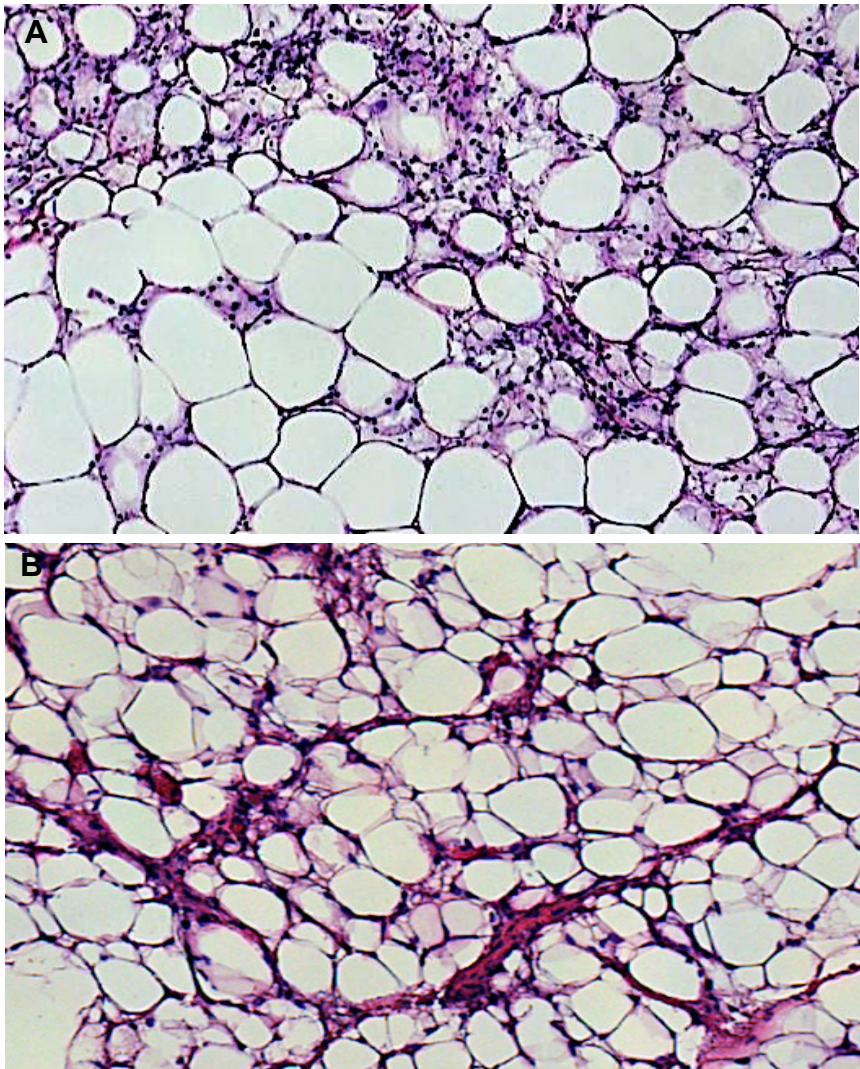


Figura 31.- Implante de TA previamente criopreservado durante 2 meses. TA criopreservado con HES (A: 40x, grupo B) y con trehalosa (B: 40x, grupo D).

10.6 Estudio de viabilidad del TA criopreservado e implantado en modelo animal

El estudio de viabilidad en los implantes de TA del modelo animal se llevó a cabo mediante análisis de los niveles de expresión del gen GAPDH por TaqMan-PCR (Figura 32).

La cuantificación de la expresión génica de la GAPDH nos permitió comprobar si las células de los implantes de TA cumplían su ciclo de manera normal y si se veían alteradas por el uso de diferentes ACPs y en función de las diferentes condiciones de criopreservación.

GAPDH se expresó en todas las muestras de los implantes de TA de todos los grupos experimentales. En los implantes criopreservados con HES (Figura 32A) no se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p>0,05$) en la expresión relativa de GAPDH entre los implantes criopreservados durante 1 mes (Grupo A: $6,74\pm 0,43$), 2 meses (Grupo B: $6,54\pm 0,84$) o en comparación con el TA implantado en fresco (Control; $6,81\pm 0,63$).

Tampoco encontramos diferencias estadísticamente significativas ($p>0,05$) en la expresión relativa de GAPDH entre los implantes previamente criopreservados con trehalosa durante 1 mes (Grupo C: $6,17\pm 0,17$) o 2 meses (Grupo D: $7,26\pm 0,62$) ni respecto al TA fresco (Grupo Control; $6,81\pm 0,63$) (Figura 32B).

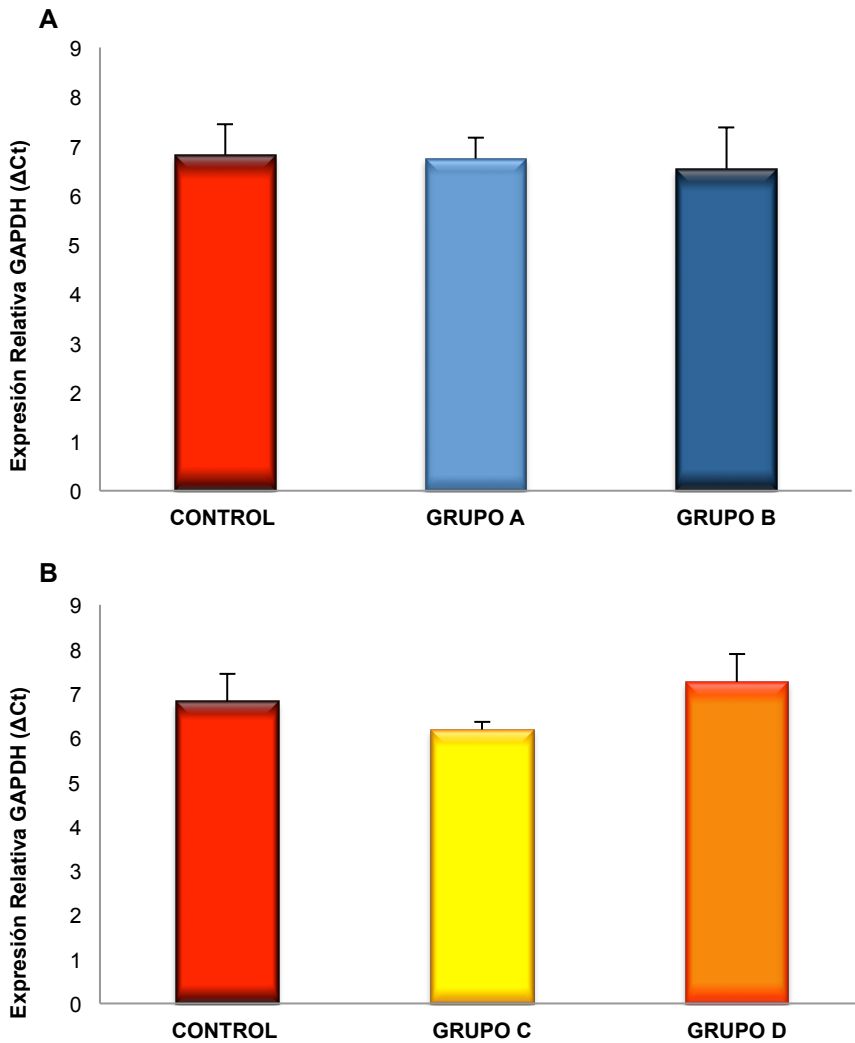


Figura 32.- Expresión relativa de GAPDH de los implantes de TA según el tiempo de criopreservación. Implantes de TA criopreservado con HES durante 1 y 2 meses (A). Implantes de TA criopreservado con trehalosa durante 1 y 2 meses (B). Datos expresados como media \pm DE.

Cuando se comparó la expresión relativa de GAPDH entre los implantes criopreservados según el ACP utilizado y TA fresco

tampoco se encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los implantes criopreservado con HES y trehalosa durante 1 mes o comparados con los implantes de TA Fresco (Figura 33A) ni entre los implantes criopreservados con HES o trehalosa durante 2 meses o comparados con el grupo control (Figura 33B).

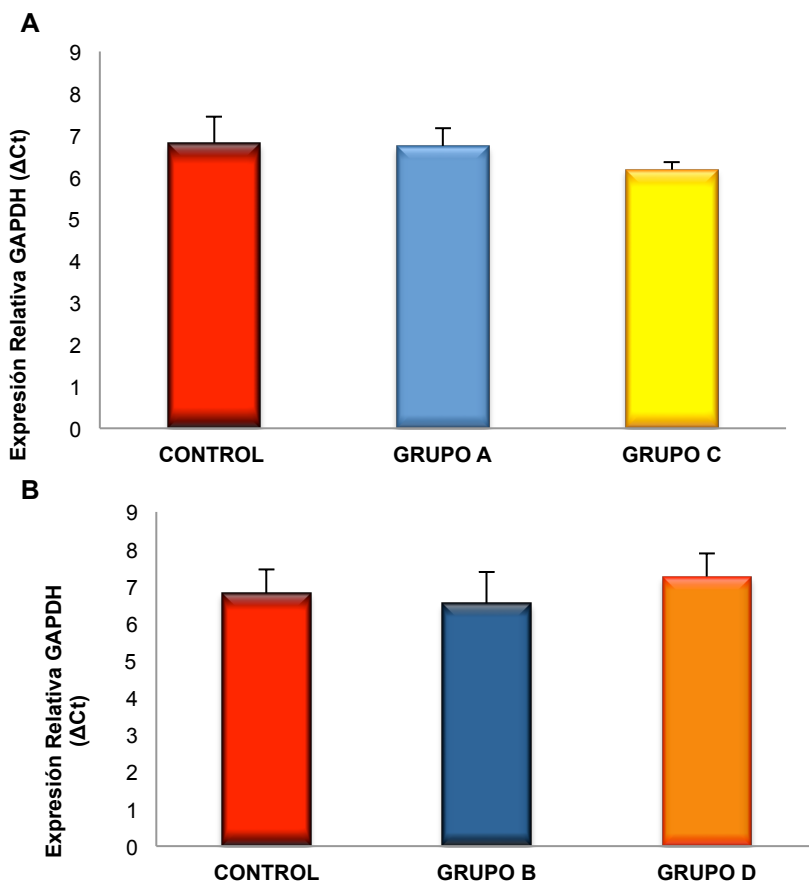


Figura 33.- Expresión relativa de GAPDH de los implantes de TA según el ACP utilizado. Implantes de TA criopreservado con HES y trehalosa durante 1 mes (A). Implantes de TA criopreservado con HES y trehalosa durante dos meses (B). Datos expresados como media \pm DE

10.7 Estudio de la vascularización del TA criopreservado e implantado en modelo animal

El estudio de vascularización en los implantes de TA del modelo animal se llevó a cabo mediante análisis de los niveles de expresión del gen VEGF por TaqMan-PCR.

El VEGF se expresó en todas las muestras de los implantes de TA de todos los grupos experimentales. El VEGF es un indicador de invasión vascular y por lo tanto de un adecuado prendimiento, permitiéndonos evaluar la adecuada integración de los injertos en los tejidos receptores.

Entre los implantes de TA previamente criopreservados con el HES durante 1 (Grupo A: $14,93 \pm 1,94$) o 2 meses (Grupo B: $14,27 \pm 2,52$) no se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) en la expresión relativa de VEGF, ni tampoco respecto al TA Fresco (Grupo Control: $16,17 \pm 1,72$) (Figura 34A).

Tampoco encontramos diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en la expresión relativa del VEGF entre los implantes de TA criopreservado con trehalosa durante 1 (Grupo C: $15,49 \pm 1,61$) o 2 meses (Grupo D: $16,61 \pm 1,63$) ni en comparación con el TA fresco (Figura 34B).

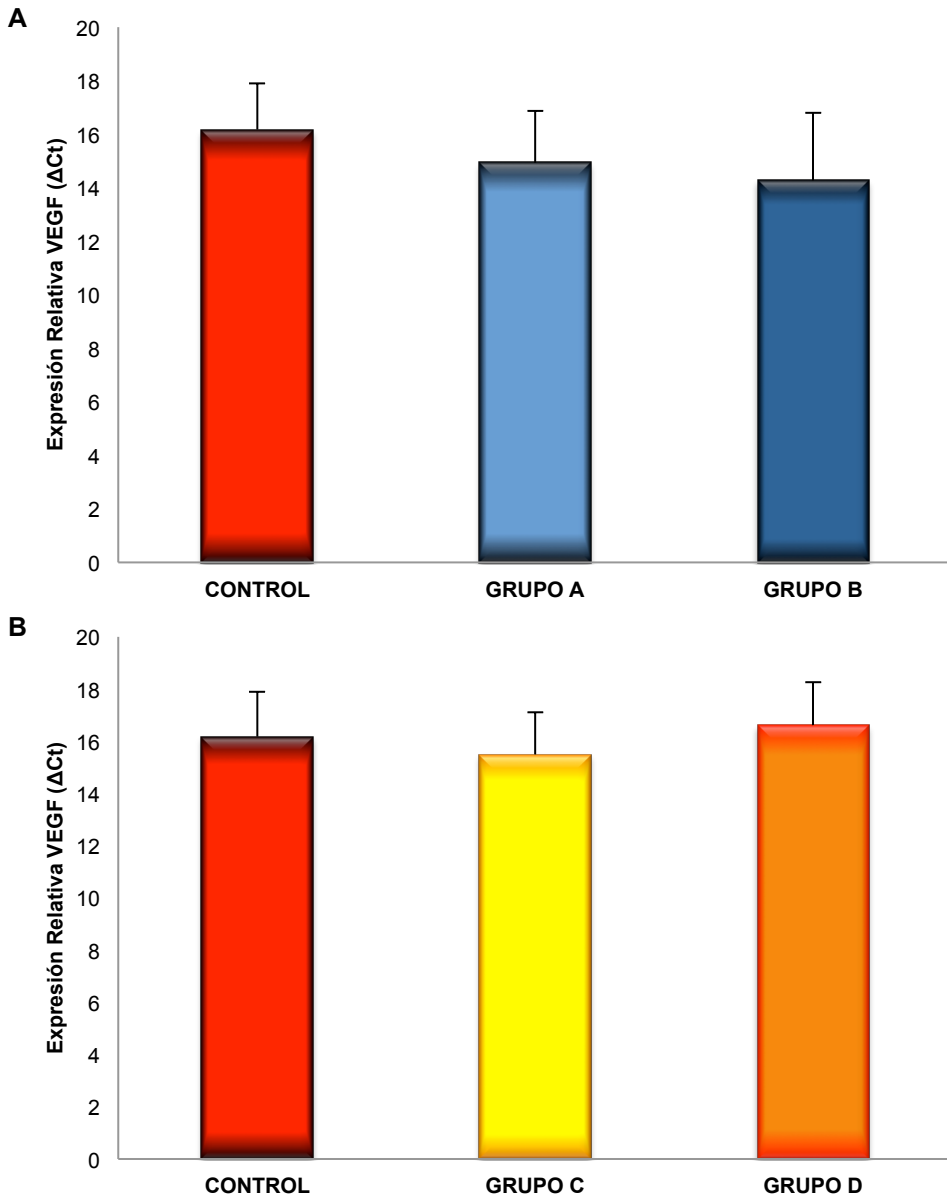


Figura 34.- Expresión relativa del VEGF en los implantes de TA según el tiempo de criopreservación. Implantes de TA criopreservado con HES durante 1 y 2 meses (A). Implantes de TA criopreservado con trehalosa durante 1 y 2 meses (B). Datos expresados como media±DE.

Cuando se comparó la expresión relativa del VEGF entre los implantes criopreservados el mismo tiempo pero con diferentes ACPs no se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) entre los implantes de TA criopreservado con HES y trehalosa durante 1 mes o comparados con los implantes de TA Fresco (Figura 35A), ni entre los implantes criopreservados con HES o trehalosa durante 2 mes o comparados con el grupo control ($p > 0,05$) (Figura 35B).

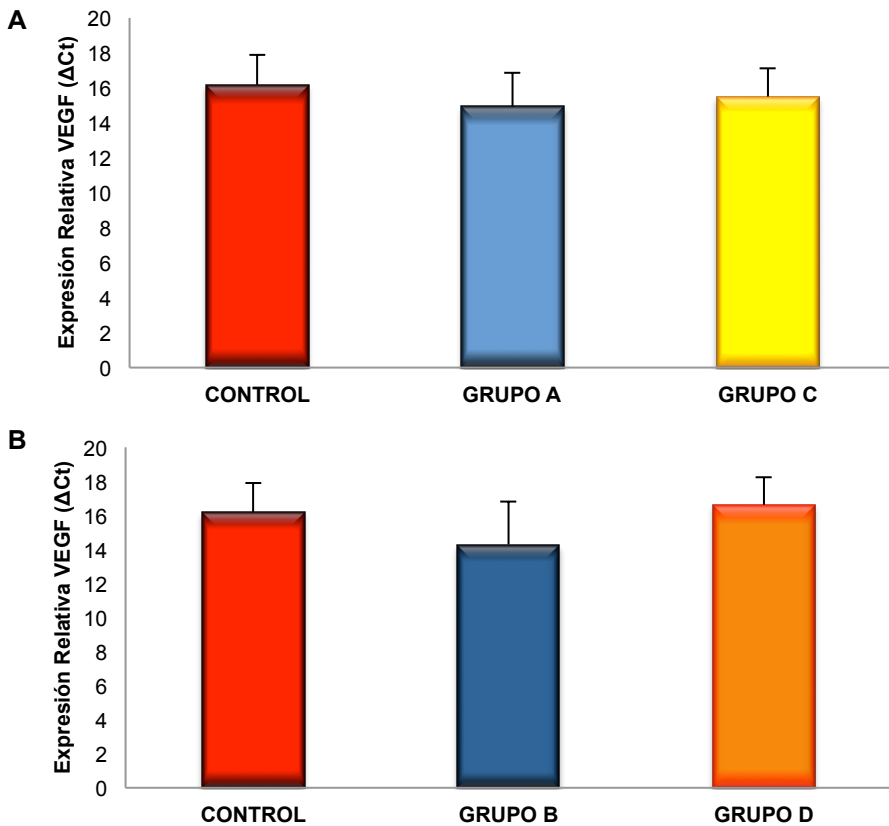


Figura 35.- Expresión relativa del VEGF en los implantes de TA según el ACP utilizado. Implantes de TA criopreservado con HES y trehalosa durante 1 mes (A). Implantes de TA criopreservado con HES y trehalosa durante dos meses (B). Datos expresados como media±DE.

:: DESARROLLO ARGUMENTAL

11 DESARROLLO ARGUMENTAL

Al analizar los resultados de prendimiento (equivalente a porcentaje de peso retenido tras un mes de implante) que hemos obtenido, se observa que la tasa promedio de prendimiento de TA en el modelo “in vivo” fue de $26,61 \pm 12,12\%$. Las tasas de prendimiento mayores fueron las del grupo control ($33,77 \pm 9,63\%$), y la del grupo criopreservado 2 meses con HES ($32,17 \pm 14,19\%$). Sin embargo no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la tasa del prendimiento y el uso de diferentes ACP respecto al grupo control, y tampoco se encontraron diferencias estadísticamente significativas al comparar según el tiempo de criopreservación. Al analizar otros estudios similares, en el modelo “in vivo”, no es frecuente que los autores cuantifiquen el peso pre y post-implantacional y con él el prendimiento, lo cual es un parámetro bastante interesante en este tipo de estudios experimentales. En el estudio de Cui y cols. (41) sí determinan el peso pre y post-implantacional, de implantes de TA de 3 grupos diferentes, tras 4 meses de implantación en ratones inmunodeprimidos tipo “nude”. Sus resultados son similares a los nuestros, ya que el peso preimplantación de sus injertos fue de alrededor de un gramo de peso cada uno, el grupo control presenta un peso final promedio de $0,44 \pm 0,14$ g, el grupo en el que utilizaron como crioprotectores una mezcla $0,5M$ DMSO+ $0,2M$ trehalosa

presentó un peso final de $0,32\pm 0,09$ g, y las muestras criopreservadas sin ACP sólo mantuvieron $0,05\pm 0,02$ g (es decir, sus tasas de prendimiento fueron aproximadamente 44%, 32% y 5% respectivamente).

En condiciones clínicas óptimas el prendimiento de los injertos es también muy variable, y siempre se somete a mayores o menores tasas de reabsorción. Cuando utilizamos injertos de TA en la práctica clínica con pacientes se les prescribe reposo y no movilizar la zona que se acaba de injertar, se les aplica un vendaje protector durante los primeros días para mejorar el prendimiento, e incluso con estas medidas se han descrito grandes tasas de reabsorción del injerto, de hasta el 70 y 85% (3,28,30). En nuestro estudio experimental, el propio modelo animal podría justificar esa tasa de prendimiento, ya que un prendimiento similar está presente en todos los grupos, incluyendo el tejido en fresco. Por el propio movimiento y actividad constante de los ratones, se podría favorecer la reabsorción parcial de los injertos, en nuestro estudio situados en el tejido subcutáneo del dorso de cada animal.

Por otro lado, hablar de tasa de prendimiento conlleva inevitablemente cierta inexactitud, y más aún el contexto clínico, ya que no existen métodos validados o exactos para medirla o estimarla. En la práctica clínica no se podría emplear el método expuesto en nuestro modelo animal, que no es más que una asimilación de la tasa de prendimiento

con la tasa de retención de peso del injerto de TA. En clínica, a pesar de que se pueda pesar el TA que se va a injertar, no es posible recuperarlo después para volver a realizar esta medición, y los estudios histológicos en general supondrían un método invasivo no aceptable. En nuestro modelo animal es fácil caracterizar el peso del injerto de TA antes y después, ya que incluso después de un mes de implantación es fácilmente reconocible y disecable del resto de tejidos del ratón, que por otra parte presentan escasa cantidad de TA subcutáneo en el dorso. La medición del peso previo al implante podría presentar inexactitudes porque no es infrecuente que dentro del injerto quede una parte de suero, células adipocitarias rotas, y otros componentes que serán reabsorbidos, y que están contribuyendo al peso pre-implantacional.

Por lo tanto, pese a que en este estudio hablamos de tasa de prendimiento, hay que tener en cuenta que es una asimilación al porcentaje de peso retenido del injerto de TA, sin tener en cuenta qué porcentaje de ese peso son realmente células adiposas vivas y qué porcentaje está formado por otros componentes. En nuestra práctica habitual no es correcto hablar de este parámetro por la imposibilidad de medir los pesos del injerto antes y después del implante. Un método que se ha mostrado efectivo es el utilizado en su estudio por Fontdevila y cols. (29) en el cual se calculó el volumen de TA mediante TAC, realizando la prueba antes del implante de TA, y a los 2 y 12 meses tras el implante de TA,

viendo su evolución en el tiempo, y pese a observarse una clara conservación e incluso aumento del volumen de tejido adiposo después de un año, no utilizan el término de tasa de prendimiento.

Respecto a la T^a de criopreservación, aunque la T^a óptima para criopreservar TA humano está todavía bajo investigación, varios estudios hasta la fecha sugieren que la criopreservación usando T^a de -20°C es suficiente para mantener la viabilidad del TA (30,48,67) lo cual sería fácilmente aplicable a un contexto clínico ya que sería suficiente con un congelador comercial, respecto a la criopreservación usando T^a de -80°C o usando nitrógeno líquido, lo que requiere instalaciones complejas, mayores requerimientos técnicos, espacio extra y un coste económico más elevado (39).

En el estudio de Bo Wen Li y cols. (48), publicado en 2012, el TA se criopreserva a -20°, -80° y -196°, usando tanto HES como una solución salina, y se inyecta en ratones inmunodeprimidos tipo nude 2 y 4 semanas tras la criopreservación. Posteriormente se realizaron estudios histológicos en los que no se encontraron diferencias significativas entre las tres T^a de conservación en cuanto a la viabilidad celular del TA.

Sommer y cols. publicaron en 2000 (30) un estudio que demostraba que la congelación lenta del tejido hasta -20° no

tenía un efecto dañino en los adipocitos y que permanecen un gran número de células viables tras la descongelación. En su estudio el TA es descongelado después de 3 años de criopreservación, y tras realizar estudios histológicos con tinción de la membrana con Azul Tripán, los autores defienden que perduran gran cantidad de células vivas. Este método está presente en varios estudios como modo de valorar la viabilidad (68). Sin embargo, el método de Azul Tripán no es considerado por algunos autores como adecuado para determinar la viabilidad del TA, ya que en ocasiones hay adipocitos con daños celulares importantes, sin núcleo, o sin actividad mitocondrial, que mantienen una forma normal bajo el microscopio, y que son erróneamente considerados como células vivas, por ello no es aconsejable utilizarlo de forma aislada para la determinación de la viabilidad adipocitaria (46).

Shoshani y cols. en 2001 (67) publicaron un estudio donde el TA se almacenaba a -18° C durante 2 semanas y posteriormente se injertaba en ratones nude; ellos estudiaron el prendimiento del injerto, el peso y volumen retenido, y parámetros histológicos, sin encontrar ninguna diferencia estadísticamente significativa entre el grupo experimental y el control.

El estudio de Atik y cols. (2006) (39) compara el TA en fresco con TA criopreservado a -35° C durante 6 meses en 3 modalidades: congelación seca, directamente a -35° ,

congelación a -35° añadiendo glicerol y congelación con inmersión inicial en nitrógeno líquido, para después conservarlo a -35° ; los especímenes congelados fueron almacenados durante 6 meses en un congelador convencional a -35°C independientemente del método de criopreservación. La inmersión previa en nitrógeno líquido seguida de criopreservación a -35°C mostró unos scores de viabilidad similar a los grupos control (tejido en fresco), siendo los resultados más similares en cuanto a proporción de tejido graso y degeneración vacuolar. Los parámetros en los otros dos grupos experimentales fueron pobres con una viabilidad adiposa baja. Sin embargo, este estudio muestra que el almacenamiento a -35°C , que es fácilmente accesible y de fácil mantenimiento, preserva una viabilidad apropiada, cuando se criopreserva con una inmersión inicial en nitrógeno líquido. Por otra parte este estudio es interesante ya que realiza la criopreservación en un período prolongado de tiempo (6 meses).

En cuanto a la variable de tiempo de criopreservación, hemos querido también introducir este parámetro en las comparaciones en el estudio in vivo para ver si encontrábamos diferencias entre los grupos experimentales, tanto a nivel histológico, como en los marcadores de viabilidad o en la expresión del VEGF al criopreservar las muestras durante 1 mes frente a 2 meses, previo a su implante en los animales de experimentación. No encontramos diferencias estadísticamente significativas.

Pocos estudios incluyen esta comparativa y tampoco criopreservan durante tiempos prolongados, la mayoría se limitan a criopreservar durante horas o días (40,41). Hay excepciones como el estudio ya comentado de Atik y cols., donde el tiempo de criopreservación fueron 6 meses (39), o en el estudio de Chaput y cols., (69) donde tras un estudio preliminar, seleccionan como protocolo de criopreservación una mezcla de DMSO y HES, a una Tª de -80 y -196°, y comparan la criopreservación durante 8 días frente a 31, analizando las características histológicas y la presencia de células madre mediante caracterización inmunofenotípica. En su estudio, muestran una leve disminución de las células vivas al criopreservarlas durante 1 mes, aunque no alcanzó significación estadística y la tasa de ADSCs es muy similar en todas las comparaciones. Donde sí ven diferencias, alcanzando en algunas de las comparaciones significación estadística, es en la comparación de Tª, obteniendo mejor conservación del TA a -80°C que a -196°.

Existen una gran cantidad de estudios sobre el tema, muchos los hemos ido comentando a lo largo del desarrollo de este trabajo, y lo que queda claro es que existe una gran heterogeneidad entre todos ellos, con las diferentes Tª utilizadas, los diferentes agentes crioprotectores, los protocolos para la obtención del TA (14,15,70), la diferente metodología en la criopreservación y descongelación, y/o los diferentes análisis y métodos para determinar la viabilidad. Al revisar detalladamente cada estudio, vemos que no hay

ningún estudio perfecto, ya que en muchos faltan detalles sobre la metodología para realizar la criopreservación, o no dan detalles acerca de la rapidez de congelación y descongelación (que supone un factor crucial a la hora de valorar la viabilidad celular), o faltan otros aspectos importantes. Muy a menudo los resultados presentados en los diferentes estudios son contradictorios y confusos. No existe un método estandarizado de criopreservación, no se conoce aún la T^a ni el ACP más adecuado, es más, tampoco existe un método perfecto para determinar la viabilidad del TA. Sin embargo, ciertos procedimientos metodológicos sí han sido aceptados y relacionados experimentalmente con una buena viabilidad adipocitaria, procedimientos tales como la criopreservación mediante congelación lenta (a -1/-2°C), la descongelación rápida en un baño de agua caliente a 37-40°C, así como también la utilización de ACPs (46).

Esta heterogeneidad en los resultados obtenidos es probablemente debida a la diversidad presente en los métodos de obtención, procesamiento, manejo y análisis que se observan en los diferentes estudios. La viabilidad celular del TA va a estar afectada por múltiples variables como los métodos de recogida de muestras, el almacenamiento, la lipoinyección, el uso de diferentes ACP, la concentración a la que se use el ACP, el procedimiento de congelación y descongelación, la tasa de descenso y ascenso de la T^a, y/o la duración de la criopreservación. Entre los métodos de evaluación de viabilidad, hay un amplio abanico de estudios:

análisis de histología, análisis de expresión de GAPDH, tinción con Azul Tripán, análisis de expresión de MTT, XTT (actividad mitocondrial), y análisis de peso y volumen pre y post implantación.

Es por ello que en nuestro estudio, cuyo objetivo es desarrollar un protocolo de criopreservación simplificado, que sea aplicable a la clínica, detallamos la metodología de una forma rigurosa, usando un protocolo de congelación y descongelación lenta, seleccionando dos ACP no tóxicos y con buenos resultados de viabilidad adipocitaria en estudios previos, y comparamos dos T^a de criopreservación, -20°C y -80°C. Para evaluar la calidad de los protocolos utilizamos múltiples determinaciones: cuantificación del volumen y masa inyectados antes de la implantación y tras el sacrificio de los animales, exámenes histológicos, cuantificación de la expresión de GAPDH como marcador de viabilidad celular, cuantificación de expresión de VEGF como marcador de angiogénesis e invasión vascular del implante de TA en el modelo “in vivo”. De este modo, con los parámetros estudiados conseguimos tener una visión global de los efectos de nuestro protocolo de criopreservación sobre el TA, tanto a nivel físico (peso y volumen), histológico, como molecular (expresión de GAPDH y VEGF), pudiendo así sacar conclusiones sólidas sobre viabilidad, adecuadamente fundamentadas en estas determinaciones.

La criopreservación utilizando T^a de -20°C presenta varias ventajas sobre la criopreservación a T^a más bajas, como la rapidez y disminución de costes económicos, la preservación de la viabilidad y la supervivencia del tejido, para su empleo en la clínica humana.

Una de las limitaciones del estudio ha sido el hecho de poner 2 injertos en el mismo ratón. Los dos injertos fueron implantados, en el dorso del ratón, uno en la zona más craneal, y otra más caudal. Esto podría suponer una variación de los resultados obtenidos en cuanto a prendimiento en el caso de que una de las zonas de implantación estuviese de base más vascularizada que la otra, y viceversa. Para solventar esta variabilidad, los resultados obtenidos se analizaron de forma independiente según la posición del implante, no encontrándose diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la viabilidad, prendimiento y la vascularización en las diferentes localizaciones.

Otra limitaciones, derivada de la anterior, es el pequeño tamaño muestral: 15 ratones que albergaban 30 muestras de TA. Las 30 muestras representaban los 5 grupos experimentales (6 muestras de TA por grupo experimental), por lo que sería interesante ampliar el tamaño muestral para determinar si se alcanza significación estadística en alguna de las comparaciones. Por otro lado, otros aspectos interesantes hacia los que se podrían orientar nuevos

estudios serían ampliar el tiempo de criopreservación (más de 2 meses), así como ampliar el tiempo de implantación en los animales de experimentación, y determinar si hay fenómenos de reabsorción tardíos.

El próximo paso será poner en marcha un ensayo clínico en el Hospital Universitari i Politècnic La Fe de València para estudiar la aplicación de estos protocolos de criopreservación de TA en humanos, dado los buenos resultados experimentales obtenidos tanto en el estudio experimental preliminar como en el estudio “in vivo”. El TA criopreservado sería almacenado y gestionado por el banco de tejidos del Hospital La Fe (u otro equiparable), cumpliendo con los requisitos de seguridad y con los protocolos de manejo y almacenamiento de los tejidos requeridos para este fin. Sería interesante la inclusión en el estudio de otros hospitales para la realización de un ensayo multicéntrico.

:: CONCLUSIONES

12 CONCLUSIONES

1. Con este estudio se han desarrollado dos protocolos de criopreservación de TA simplificados que mantienen la viabilidad y funcionalidad del TA una vez descongelado y/o trasplantado a animales de experimentación (objetivo principal del estudio).
2. El estudio inicial demuestra que los protocolos de criopreservación de TA elaborados, utilizando T^a de -20°C y -80°C, y como ACPs HES y trehalosa, mantienen la viabilidad y supervivencia del TA.
3. Los estudios “in vivo” de TA criopreservado a -20° con los dos ACPs durante 1 y 2 meses demostraron unas tasas de prendimiento, características histológicas, viabilidad y grado de vascularización similares al TA fresco.
4. Los estudios “in vivo” demostraron también que el tiempo de criopreservación no altera de forma significativa las características histológicas, la viabilidad, el prendimiento o vascularización de los implantes de TA criopreservado en comparación con el TA fresco.
5. Los estudios desarrollados en esta tesis doctoral demuestran la fácil aplicabilidad clínica de la criopreservación de TA para su posterior autotransplante debido a su sencillez protocolaria y efectividad de resultados, por lo que en un futuro

deberían ser testados en un ensayo clínico con pacientes.

:: BIBLIOGRAFÍA

13 BIBLIOGRAFÍA

(1) Born TM, Airan LE, Motakis D. Soft-tissue fillers. In: Neligan PC, editor. *Plastic Surgery*. 3rd ed.: Elsevier; 2013. p. 44-59 e3.

(2) Jatana KR, Smith SP, Jr. The scientific basis for lipotransfer: is it the ideal filler? *Facial Plast Surg Clin North Am* 2008 Nov;16(4):443-8, vi-vii.

(3) Fulton JE, Parastouk N. Fat grafting. *Facial Plast Surg Clin North Am* 2008 Nov;16(4):459-65, vii.

(4) Neuber G. Fettransplantation. *Chir Kongr Verhandl Deutsche Gesellsch Chir* 1893;22:66-68.

(5) Czerny V. Drei plastische Operationen. III. Plastischer Ersatz der Brustdrüse durch ein Lipom. *Arch F Klin Chir* 1895;50:544-550.

(6) Bruning P. Cited by Broeckaert, T.J. Contribution a l'etude des greffes adipeuses. *Bull Acad R Med Belgique* 1914;28:440.

(7) Hollander E. Über einen Fall von fortschreitenden Schwund des Fettgewebes und seinen kosmetischen Ersatz durch Menschenfett. *Münch med Wchschr* 1910;57:1794-S.

(8) Holländer E. Die kosmetische Chirurgie. In: Veit&Co, editor. Joseph, M. *Handbuch der kosmetik*. Leipzig (Germany); 1912. p. 689-690-708.

(9) Lexer E. Die freien Transplantationen. Stuttgart (Germany): Enke; 1924. p. 265-302.

(10) Mazzola RF, Mazzola IC. History of fat grafting: from ram fat to stem cells. *Clin Plast Surg* 2015 Apr;42(2):147-153.

(11) Miller C editor. *Cannula implants and review of implantation techniques in Esthetic Surgery*. 25-30; 66-71. Chicago: The oak press; 1926.

(12) Peer LA. Cell survival theory versus replacement theory. *Plast Reconstr Surg* (1946) 1955 Sep;16(3):161-168.

- (13) Illouz YG. The fat cell "graft": a new technique to fill depressions. *Plast Reconstr Surg* 1986 Jul;78(1):122-3.
- (14) Coleman SR. Hand rejuvenation with structural fat grafting. *Plast Reconstr Surg* 2002 Dec;110(7):1731-44.
- (15) Coleman SR. Structural fat grafting: more than a permanent filler. *Plast Reconstr Surg* 2006 Sep;118(3 Suppl):108S-120S.
- (16) Pu LL, Coleman SR, Cui X, Ferguson RE, Jr, Vasconez HC. Autologous fat grafts harvested and refined by the Coleman technique: a comparative study. *Plast Reconstr Surg* 2008 Sep;122(3):932-937.
- (17) Lin J, Wang C, Pu LLQ. Can We Standardize the Techniques for Fat Grafting? *Clin Plast Surg* 2015 4;42(2):199-208.
- (18) Rigotti G, Marchi A, Galie M, Baroni G, Benati D, Krampera M, et al. Clinical treatment of radiotherapy tissue damage by lipoaspirate transplant: a healing process mediated by adipose-derived adult stem cells. *Plast Reconstr Surg* 2007 Apr 15;119(5):1409-22; discussion 1423-4.
- (19) Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 2001 Apr;7(2):211-228.
- (20) Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* 2002 Dec;13(12):4279-4295.
- (21) Minteer DM, Marra KG, Rubin JP. Adipose stem cells: biology, safety, regulation, and regenerative potential. *Clin Plast Surg* 2015 Apr;42(2):169-179.
- (22) Yoshimura K, Sato K, Aoi N, Kurita M, Hirohi T, Harii K. Cell-Assisted Lipotransfer for Cosmetic Breast Augmentation: Supportive Use of Adipose-Derived Stem/Stromal Cells. *Aesthetic Plast Surg* 2008 Jan;32(1):48-55.
- (23) Kolle SF, Fischer-Nielsen A, Mathiasen AB, Elberg JJ, Oliveri RS, Glovinski PV, et al. Enrichment of autologous fat grafts with ex-vivo expanded adipose tissue-derived stem cells for graft survival: a

randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 2013 Sep 28;382(9898):1113-1120.

(24) Rehman J, Traktuev D, Li J, Merfeld-Clauss S, Temm-Grove CJ, Bovenkerk JE, et al. Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. *Circulation* 2004 Mar 16;109(10):1292-1298.

(25) Molto Garcia R, Gonzalez Alonso V, Villaverde Domenech ME. Fat grafting in immediate breast reconstruction. Avoiding breast sequelae. *Breast Cancer* 2016 Jan;23(1):134-140.

(26) Coleman SR, Saboeiro. A.P. Augmentation of facial structures with autologous fat. In Guyuron, B. *Plastic Surgery: Indications and practice*. 1st ed.: Elsevier; 2009. p. 1555-1560.

(27) J. Fontdevila. Atrofia de la grasa facial en los pacientes VIH+. Tratamiento mediante inyección de tejido adiposo autólogo. *Universitat de Barcelona*; 2007.

(28) Eto H, Kato H, Suga H, Aoi N, Doi K, Kuno S, et al. The fate of adipocytes after nonvascularized fat grafting: evidence of early death and replacement of adipocytes. *Plast Reconstr Surg* 2012 May;129(5):1081-1092.

(29) Fontdevila J, Serra-Renom JM, Raigosa M, Berenguer J, Guisantes E, Prades E, et al. Assessing the long-term viability of facial fat grafts: an objective measure using computed tomography. *Aesthet Surg J* 2008 Jul-Aug;28(4):380-386.

(30) Sommer B, Sattler G. Current concepts of fat graft survival: histology of aspirated adipose tissue and review of the literature. *Dermatol Surg* 2000 Dec;26(12):1159-1166.

(31) Lázaro C, Enrique BJ, Herley AS, Jesús C. Deaths Caused by Gluteal Lipoinjection: What Are We Doing Wrong?. *Plast Reconstr Surg* 2015 Jul;136(1):58-66.

(32) Sherman JE, Fanzio PM, White H, Leifer D. Blindness and necrotizing fasciitis after liposuction and fat transfer. *Plast Reconstr Surg* 2010 Oct;126(4):1358-1363.

(33) Kierszenbaum AL, Tres LL. Chapter 4: Connective tissue. In: Kierszenbaum AL, editor. *Histology and Cell Biology: An Introduction to Pathology*. Fourth Edition ed. New York: Saunders, Elsevier; 2016. p. 123-159.

(34) Tallitsch RB, Guastaferrri RS. Chapter 3: Connective tissue proper. In: Tallitsch RB, editor. *Histology: An Identification Manual*. First Edition ed. Illinois: Mosby, Elsevier; 2009. p. 41-54.

(35) Coleman III WP. Fat Transplantation. *Facial Plastic Surgery Clinics of North America* 2008 11;16(4):451-458.

(36) Feng Z, Ting J, Alfonso Z, Strem BM, Fraser JK, Rutenberg J, et al. Fresh and cryopreserved, uncultured adipose tissue-derived stem and regenerative cells ameliorate ischemia-reperfusion-induced acute kidney injury. *Nephrol Dial Transplant* 2010 Dec;25(12):3874-3884.

(37) Erdim M, Tezel E, Numanoglu A, Sav A. The effects of the size of liposuction cannula on adipocyte survival and the optimum temperature for fat graft storage: an experimental study. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 2009 Sep;62(9):1210-1214.

(38) Wolter TP, von Heimburg D, Stoffels I, Groeger A, Pallua N. Cryopreservation of mature human adipocytes: in vitro measurement of viability. *Ann Plast Surg* 2005 Oct;55(4):408-413.

(39) Atik B, Ozturk G, Erdogan E, Tan O. Comparison of techniques for long-term storage of fat grafts: an experimental study. *Plast Reconstr Surg* 2006 Dec;118(7):1533-1537.

(40) Son D, Oh J, Choi T, Kim J, Han K, Ha S, et al. Viability of Fat Cells Over Time After Syringe Suction Lipectomy: The Effects of Cryopreservation. *Ann Plast Surg* 2010 September;65(3):354-360.

(41) Cui XD, Gao DY, Fink BF, Vasconez HC, Pu LLQ. Cryopreservation of human adipose tissues. *Cryobiology* 2007 12;55(3):269-278.

(42) Stolzing A, Naaldijk Y, Fedorova V, Sethe S. Hydroxyethylstarch in cryopreservation - mechanisms, benefits and problems. *Transfus Apher Sci* 2012 Apr;46(2):137-147.

- (43) Mazur P. Kinetics of Water Loss from Cells at Subzero Temperatures and the Likelihood of Intracellular Freezing. *J Gen Physiol* 1963 04/15;47(2):347-369.
- (44) Mazur P. Cryobiology: The Freezing of Biological Systems. *Science* 1970;168(3934):939-949.
- (45) MacRae JW, Tholpady SS, Ogle RC, Morgan RF. Ex vivo fat graft preservation: effects and implications of cryopreservation. *Ann Plast Surg* 2004 Mar;52(3):281-2.
- (46) Shu Z, Gao D, Pu LL. Update on cryopreservation of adipose tissue and adipose-derived stem cells. *Clin Plast Surg* 2015 Apr;42(2):209-218.
- (47) Shu Z, Heimfeld S, Gao D. Hematopoietic SCT with cryopreserved grafts: adverse reactions after transplantation and cryoprotectant removal before infusion. *Bone Marrow Transplant* 2014 Apr;49(4):469-476.
- (48) Li B, Liao W, Wu S, Ma H. Cryopreservation of Fat Tissue and Application in Autologous Fat Graft: In Vitro and In Vivo Study. *Aesthetic Plast Surg* 2011;36(3):714-722.
- (49) Crowe JH, Crowe LM, Oliver AE, Tsvetkova N, Wolkers W, Tablin F. The trehalose myth revisited: introduction to a symposium on stabilization of cells in the dry state. *Cryobiology* 2001 Sep;43(2):89-105.
- (50) Pasch J, Schiefer A, Heschel I, Dimoudis N, Rau G. Variation of the HES concentration for the cryopreservation of keratinocytes in suspensions and in monolayers. *Cryobiology* 2000 Sep;41(2):89-96.
- (51) Liu J, Woods EJ, Agca Y, Critser ES, Critser JK. Cryobiology of rat embryos II: A theoretical model for the development of interrupted slow freezing procedures. *Biol Reprod* 2000 Nov;63(5):1303-1312.
- (52) Choudhery MS, Badowski M, Muise A, Pierce J, Harris DT. Cryopreservation of whole adipose tissue for future use in regenerative medicine. *J Surg Res* 2014 Mar;187(1):24-35.

(53) E. Novella Maestre. Acción antiangiogénica de los agonistas dopaminérgicos en lesiones endometriósicas. Universitat de València; 2008.

(54) Jeffery CJ. Moonlighting proteins--an update. *Mol Biosyst* 2009 Apr;5(4):345-350.

(55) Sirover MA. New nuclear functions of the glycolytic protein, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, in mammalian cells. *J Cell Biochem* 2005 May 1;95(1):45-52.

(56) Hauner H, Entenmann G, Wabitsch M, Gaillard D, Ailhaud G, Negrel R, et al. Promoting effect of glucocorticoids on the differentiation of human adipocyte precursor cells cultured in a chemically defined medium. *J Clin Invest* 1989 Nov;84(5):1663-1670.

(57) Spanakis E. Problems related to the interpretation of autoradiographic data on gene expression using common constitutive transcripts as controls. *Nucleic Acids Res* 1993 Aug 11;21(16):3809-3819.

(58) Bustin SA. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol* 2000 Oct;25(2):169-193.

(59) Pfaffl MW, Tichopad A, Prgomet C, Neuvians TP. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper--Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol Lett* 2004 Mar;26(6):509-515.

(60) Posso Duque D, Ghneim Herrera T. Manual de Laboratorio: Uso de Marcadores Microsatélites para la Estimación de Diversidad Genética en Plantas. . 1ª ed. Caracas, Venezuela: Ediciones IVIC; 2008.

(61) Schade C. High-Resolution Separation of Nucleic Acid Fragments. American Laboratory. Available at: <http://www.americanlaboratory.com/914-Application-Notes/142596-High-Resolution-Separation-of-Nucleic-Acid-Fragments/>. Accessed Wednesday, August 7., 2013.

(62) Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative PCR. *Genome Res* 1996 Oct;6(10):986-994.

(63) Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001 Dec;25(4):402-408.

(64) Novella-Maestre E, Carda C, Noguera I, Ruiz-Sauri A, Garcia-Velasco JA, Simon C, et al. Dopamine agonist administration causes a reduction in endometrial implants through modulation of angiogenesis in experimentally induced endometriosis. *Hum Reprod* 2009 May;24(5):1025-1035.

(65) Novella-Maestre E, Carda C, Ruiz-Sauri A, Garcia-Velasco JA, Simon C, Pellicer A. Identification and quantification of dopamine receptor 2 in human eutopic and ectopic endometrium: a novel molecular target for endometriosis therapy. *Biol Reprod* 2010 Nov;83(5):866-873.

(66) Fleming JM, Miller TC, Meyer MJ, Ginsburg E, Vonderhaar BK. Local regulation of human breast xenograft models. *J Cell Physiol* 2010 Sep;224(3):795-806.

(67) Shoshani O, Ullmann Y, Shupak A, Ramon Y, Gilhar A, Kehat I, et al. The role of frozen storage in preserving adipose tissue obtained by suction-assisted lipectomy for repeated fat injection procedures. *Dermatol Surg* 2001 Jul;27(7):645-647.

(68) Pu LL, Coleman SR, Cui X, Ferguson RE, Jr, Vasconez HC. Cryopreservation of autologous fat grafts harvested with the Coleman technique. *Ann Plast Surg* 2010 Mar;64(3):333-337.

(69) Chaput B, Orio J, Garrido I, De Bonnecaze G, Espagnolle N, Gadelorge M, et al. A clinical scalable cryopreservation method of adipose tissue for reconstructive surgery assessed by stromal vascular fraction and mice studies. *Plast Reconstr Surg* 2014 Apr;133(4):815-826.

(70) Ramon Y, Shoshani O, Peled IJ, Gilhar A, Carmi N, Fodor L, et al. Enhancing the take of injected adipose tissue by a simple method for concentrating fat cells. *Plast Reconstr Surg* 2005 Jan;115(1):197-201; discussion 202-3.

::BIBLIOGRAFÍA

:: ANEXO

14 ANEXO

13.1 PREMIO RESIDENTES SECPRE- ACCÉSIT



PREMIO DE RESIDENTES PATROCINADO POR MENTOR



Reunido el Jurado del **PREMIO DE RESIDENTES PATROCINADO POR MENTOR** del 51º Congreso de la SECPRE celebrado en Estoril a las 17.00h compuesto por:

- Dr. Miguel Chamosa Martín: Ex Presidente y Presidente Fundación Docente SECPRE
- Dr. Cristino Suárez López de Vergara: Presidente SECPRE
- Dr. Carlos Tejerina Botella: Vocal Comisión Nacional
- Dr. Miguel Gómez Bravo: Vocal Residentes SECPRE
- Dr. Manuel Sánchez Nebreda: Ex – Presidente SECPRE

Tras la evaluación de los trabajos presentados según la normativa vigente del concurso Premio de Residentes patrocinado por Mentor:

Se resuelve dar el **ACCÉSIT**:

DRA. Mª ELOISA VILLAVERDE DOMENECH por su trabajo: “Optimización de técnicas de criopreservación de tejido adiposo”

Estoril, 3 de Junio de 2016

Dr. Miguel Chamosa Martín
Presidente Fundación Docente SECPRE

Dr. Cristino Suárez López de Vergara
Presidente SECPRE

:: ANEXO

13.2 AUTORIZACIÓN COMITÉ ÉTICO



DICTAMEN DEL COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA

Don Serafin Rodríguez Capellán, Secretario del Comité Ético de Investigación Biomédica del Hospital Universitario y Politécnico La Fe,

CERTIFICA

Que este Comité ha evaluado en su sesión de fecha **7 de octubre de 2014**, el Proyecto de Tesis titulado **“OPTIMIZACIÓN DE LAS TÉCNICAS DE CRIOPRESERVACIÓN DE TEJIDO ADIPOSEO PARA SU USO CLÍNICO.”**, con nº de registro **2014/0172**.

Que dicho proyecto se ajusta a las normativas éticas sobre investigación biomédica con sujetos humanos y es viable en cuanto al planteamiento científico, objetivos, material y métodos, etc, descritos en la solicitud, así como la Hoja de Información al Paciente y el Consentimiento Informado.

En consecuencia este Comité acuerda emitir **INFORME FAVORABLE** de dicho Proyecto de Tesis que será realizado en el Hospital Universitario y Politécnico La Fe por el/la **Dr. / Dra. MARÍA ELOISA VILLAVERDE DOMENECH** del servicio de **CIRUGIA PLASTICA** como Investigador Principal, siendo la Directora de la Tesis la **Dr. Edurne Novella Maestre**, del servicio de Obstetricia.

Miembros del CEIB:

Presidente:

Dr. JUAN SALOM SANVALERO (Unidad de Circulación Cerebral Experimental)

Vicepresidente:

Dr. JOSE VICENTE CERVERA ZAMORA (Hematología)

Secretario:

D. SERAFIN RODRIGUEZ CAPELLAN (Asesor jurídico)

Miembros:

Dr. SALVADOR ALIÑO PELLICER (Catedrático Farmacólogo Clínico)
Dra. BELEN BELTRAN NICLOS (Medicina Digestiva)
Dra. INMACULADA CALVO PENADES (Reumatología Pediátrica)
Dr. JOSE VICENTE CASTELL RIPOLL (Director de Investigación)
Dra. REMEDIOS CLEMENTE GARCIA ((Medicina Intensiva) (Miembro CBA))
Dra. MARIA JOSE GOMEZ-LECHÓN MOLINER (Investigadora del Grupo Acreditado en Hepatología Experimental)
Dr. RAMIRO JOVER ATIENZA (Doctor en biología-Universidad de Valencia- Unidad de Bioquímica y Biología Molecular)
Dr. JAVIER PEMAN GARCIA (Investigador del Grupo Acreditado multidisciplinar para el estudio de la Infección Grave)
Dr. ALFREDO PERALES MARIN (Jefe de Servicio - Obstetricia)
Dr. JOSE LUIS PONCE MARCO (Unidad de Cirugía Endocrino Metabólica)
Dr. JOSE LUIS VICENTE SANCHEZ (Jefe de sección-Unidad de Reanimación)
Dra. PILAR SAENZ GONZALEZ (Neonatología)
Dr. MELCHOR HOYOS GARCIA (Gerente del Departamento de salud nº 7-La Fe)
Dra. BEGOÑA POLO MIQUEL (Gastroenterología Pediátrica)

:: ANEXO



Comisión de Investigación

Valencia a 13 de Noviembre de 2014.

D. José Vte. Castell Ripoll, Presidente de la Comisión de Investigación del Hospital Universitario La Fe de Valencia,

INFORMA:

Que el Proyecto de Tesis titulado: "OPTIMIZACIÓN DE LAS TÉCNICAS DE CRIOPRESERVACIÓN DE TEJIDO ADIPOSEO PARA SU USO CLÍNICO" que será realizado por ella Dr./Dra. **María Eloisa Villaverde Domenech** del Servicio de Cirugía Plástica y como Investigador Principal, siendo la Directora de la Tesis la Dra. Edurne Novella Mestre del Servicio de Obstetricia del Hospital La Fe de Valencia, contiene elementos objetivos suficientes en cuanto a la Hipótesis, Planteamientos y Plan de Trabajo que, a juicio de esta Comisión, permiten pronunciarse **positivamente** en cuanto a su viabilidad.

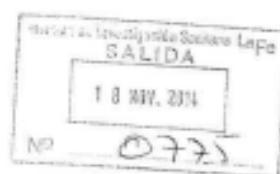


P.O.

José Vicente Castell Ripoll
Presidente de la Comisión de Investigación

:: ANEXO

:: ANEXO



María Eloisa Villaverde Domenech
Servicio de Cirugía Plástica

Asunto: Autorización Inicio Estudio.

Valencia, 13 de Noviembre de 2014 .

Adjunto le remito copia de los Informes Científico y Ético de Investigación, en el que se acuerda informar **favorablemente**.

A la vista de los dictámenes emitidos, el Proyecto de Tesis titulado: "OPTIMIZACIÓN DE LAS TÉCNICAS DE CRIOPRESERVACIÓN DE TEJIDO ADIPOSEO PARA SU USO CLÍNICO", puede iniciarse y llevarse a cabo.

Atentamente,



José Vicente Castell Ripoll
Director General

:: ANEXO

13.3 PERMISO COMITÉ BIENESTAR ANIMAL



DIRECCIÓN GENERAL DE PRODUCCIÓN AGRARIA Y GANADERÍA

Ciutat Administrativa 9 d'Octubre
Castán Tobeñas, 77. Edif. B3 P2 46018 VALENCIA

AUTORIZACION PROCEDIMIENTO 2014 / 018 / UVEG / 029

Vista la solicitud realizada en fecha 21 de febrero de 2014 con nº reg. entrada 2748 por D. Pedro M. Carrasco Sorli Vicerrector de Investigación y Política Científica de la Universidad de Valencia, centro usuario **ES46250 0001010**, para realizar el procedimiento:

“Optimización de técnicas de criopreservación de tejido adiposo para su uso clínico”

Teniendo en cuenta la documentación aportada, según se indica en el artículo 33, punto 5 y 6, y puesto que dicho procedimiento se halla sujeto a autorización en virtud de lo dispuesto en el artículo 31 del Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero,

Vista la propuesta del jefe del servicio de Sanidad y Bienestar Animal.

AUTORIZO:

la realización de dicho procedimiento al que se le asigna el código: **2014/018/UVEG/029 tipo 2**, de acuerdo con las características descritas en la propia documentación para el número de animales, especie y periodo de tiempo solicitado. Todo ello sin menoscabo de las autorizaciones pertinentes, por otras Administraciones y entidades, y llevándose a cabo en las siguientes condiciones:

Usuario: **Universidad de Valencia-Estudio General**

Responsable del proyecto: **Carmen Carda Batalla**

Establecimiento: **Animalario de mamífero superior**

Necesidad de evaluación retrospectiva:

Condiciones específicas:

Observaciones:

Valencia a, 14 de marzo de 2014

El director general de Producción Agraria y Ganadería


José Miguel Ferrer Arranz

:: ANEXO

13.4 CONGRESOS



XIV Congreso SCPRECV

Valencia doce de Diciembre de 2014

CERTIFICADO

Dña. María Eloísa Villaverde

ha participado en el XIV Congreso de la Sociedad de Cirugía Plástica, Reconstructora y Estética de la Comunidad Valenciana, celebrado en Valencia durante los días 12 y 13 de Diciembre de 2014, como Ponente.

Lo que se certifica para que conste donde convenga a petición del interesado.

D. Carlos Tejerina
Presidente SCPRECV

D. Ángel Navarro
Presidente del Congreso

:: ANEXO

50°

Congreso Nacional de la
Sociedad Española de
Cirugía Plástica, Reparadora
y Estética (SECPRE)



CERTIFICADO

Dra. María Eloísa Villaverde Doménech
Dra. Virina González Alonso
Dr. Roberto Moltó García
Dra. Edurne Novella Maestre
Dr. Juan Ramón Esteban Vico
Dr. Luis Miranda Gómez
Dra. Trinidad Delgado Ruiz

ha participado en el 50º Congreso Nacional de la Sociedad Española de Cirugía Plástica, Reparadora y Estética (SECPRE) celebrado los días 20, 21 y 22 de mayo de 2015 en Toledo, con la Comunicación Oral:

OPTIMIZACIÓN DE TÉCNICAS DE CRIOPRESERVACIÓN DE TEJIDO ADIPOSO

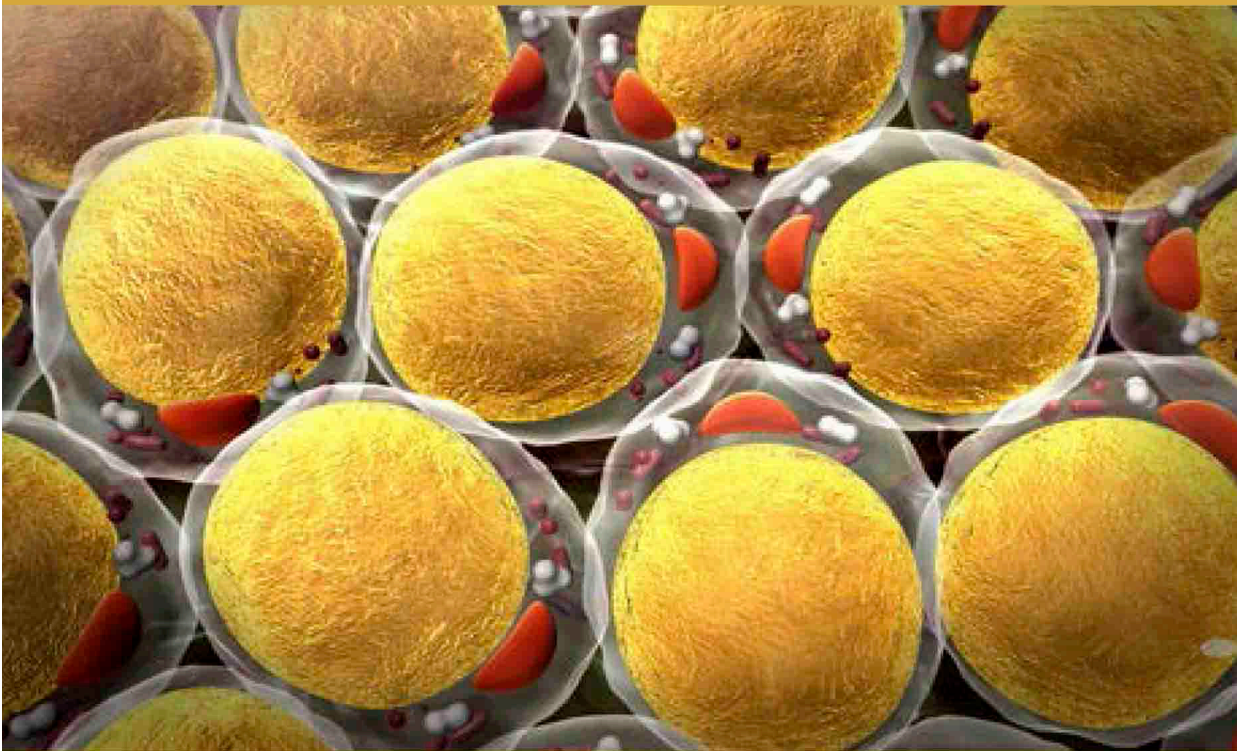
Toledo, 22 de mayo de 2015

Dr. Cristino Suárez
López de Vergara
Presidente de la SECPRE

Dr. José Javier de la Fuente
Núñez
Presidente del Congreso

Dr. Miguel Chamosa Martín
Presidente de la Fundación
Docente SECPRE

:: ANEXO



VNIVERSITAT
D VALÈNCIA