

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE POSTGRADO**



**EFFECTOS DE DIFERENTES MEDIOS DE CRIOPRESERVACIÓN
SOBRE LA VIABILIDAD DE LAS CÉLULAS ADHERENTES DE LA
FRACCIÓN VASCULAR ESTROMAL DERIVADAS DEL TEJIDO
ADIPOSO: ¿CUÁL ES EL MEJOR MEDIO CRIOPROTECTOR?**

NICOLÁS FELIPE PEREIRA COVARRUBIAS

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAGISTER EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y
MÉDICAS MENCIÓN BIOLOGÍA CELULAR

Director de Tesis: Prof. Dr. Pablo Caviedes

**2015
UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE POSTGRADO**

INFORME DE APROBACION TESIS DE MAGISTER

Se informa a la Comisión de Grados Académicos de la Facultad de Medicina, que la Tesis de Magister presentada por el candidato

NICOLÁS FELIPE PEREIRA COVARRUBIAS

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al Grado de Magister en Ciencias Biológicas y Médicas mención Biología Celular en el Examen de Defensa de Tesis rendido el día Martes 30 de Junio de 2015

**Prof. Dr. Pablo Caviedes
Director de Tesis
Programa de Farmacología Molecular y Clínica (ICBM)**

COMISION INFORMANTE DE TESIS

Prof. Dr. Carlos Sciaraffia

Prof. Dr. Roberto Ebensperger

**Prof. Dr. Juan Pablo Rodríguez
Presidente Comisión**

***A Kathy,
que ilumina mis mañanas
y hace que la vida baile con nosotros***

AGRADECIMIENTOS

En estas líneas quisiera agradecer a quienes hicieron posible la realización de este trabajo, tanto por su apoyo técnico como emocional.

A mi Director de Tesis Prof. Dr. Pablo Caviedes, quien me abrió las puertas de su Laboratorio y confió en mí, para el desarrollo de este proyecto.

A mi amigo y colega Esteban González, quien me apoyó y asesoró en todo momento y cada vez que lo necesitaba.

A la Dra. María Julieta González, quién sin duda me motivó e impulsó a sacar adelante este trabajo.

A mi mentor Dr. Carlos Sciaraffia, quién con su ayuda y ejemplo permitió el desarrollo y finalización de este proyecto.

Al personal del Laboratorio de Cultivo de Tejidos y Terapia Celular, quienes con su silencioso trabajo permitieron la realización de ésta y muchas otras investigaciones.

Mención aparte tiene mi familia; mis padres Fernando y Paz, mis hermanos Andrés, Sebastián y José Tomás, a quienes agradezco su apoyo, comprensión y cariño incondicional. Por entenderme y acompañarme siempre durante estos catorce largos años de formación como Médico, Cirujano General, Cirujano Plástico y ahora Magíster en Ciencias; y en estos treinta y dos años de formación como persona.

A mi amiga, compañera y pareja, Katherine Olmedo, quien con su infinito amor y comprensión, hace que ningún desafío sea imposible.

Gracias a la suerte, gracias a la vida y gracias al destino. Gracias porque sí y porque no. Gracias porque he aprendido. Gracias, porque queda mucho por aprender.

Muchas gracias.

INDICE

	Página
ABREVIATURAS	7
RESUMEN	8
ABSTRACT	10
INTRODUCCIÓN	
- Del tejido adiposo a las células de la fracción vascular estromal	12
- La fracción vascular estromal y las células madres derivadas del tejido adiposo	12
- ¿Cómo se pueden obtener y preservar las ASCs?	14
- ¿Qué efectos tiene la criopreservación sobre las células?	15
- ¿Cómo actúa la criopreservación?	16
- ¿Qué estrategias de criopreservación existen?	17
- ¿De qué manera actúan los criopreservantes?	18
- ¿De qué depende la efectividad de los criopreservantes?	19
- Efecto de algunos CPAs en la viabilidad celular	20
- ¿Qué otros factores influyen en la viabilidad celular?	22
HIPÓTESIS	24
OBJETIVOS GENERALES	24
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
MATERIALES Y MÉTODOS	25
- Pacientes y muestra	25
- Obtención de la SVF-AC	25

- Proceso de criopreservación	27
- Ensayos de viabilidad	29
- Análisis estadístico	34
RESULTADOS	35
- Viabilidad obtenida mediante el Ensayo colorimétrico con MTT	35
- Viabilidad obtenida con Ioduro de Propidio por citometría de flujo	37
DISCUSIÓN	40
CONCLUSIONES	44
BIBLIOGRAFÍA	45
ANEXO 1. CONSENTIMIENTO INFORMADO	55
ANEXO 2. CERTIFICADO APROBACIÓN COMITÉ DE ÉTICA	58
ANEXO 3. PANEL DE INMUNOFENOTIPIFICACIÓN DE 3 MUESTRAS DE SVF-AC Y GUIAS PARA CARACTERIZACIÓN DE ASCs	59

ABREVIATURA

ADSC: células estromales derivadas del tejido adiposo

ASC: células madres derivadas del tejido adiposo

CPA: agente crioprotector

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO: dimetilsulfóxido

DO: densidad óptica

EG: etilenglicol

ELISA: ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas

HES: hidroxietil-almidón

HP: plasma humano

IMC: índice de masa corporal

MC: metilcelulosa

MSC: células madres mesenquimáticas

PBS: tampón fosfato salino

PI: yoduro de propidio

PVP: polivinilpirrolidona

SFB: suero fetal bovino

SVF: fracción vascular estromal

SVF-AC: células adherentes de la fracción vascular estromal

RESUMEN

El tejido adiposo cumple distintas funciones tales como protección mecánica, reserva de energía, función endocrina, etc. Durante los últimos años se ha documentado su uso como fuente abundante y accesible de células estromales multipotenciales para medicina regenerativa. Actualmente, el protocolo estandarizado comprende el procesamiento del tejido adiposo con una digestión enzimática (colagenasa) para posteriormente rescatar la fracción vascular estromal (SVF). Ésta se siembra en una matriz de plástico apta para cultivos celulares, obteniéndose un subgrupo de células elongadas que comienzan a adherirse a la placa de cultivo (SVF-AC), permitiendo la aparición de una población celular adherente denominada “células estromales derivadas del tejido adiposo”. Diversos estudios han demostrado que éstas mantienen su capacidad de diferenciación en múltiples tipos celulares (endo, meso y ectodérmico), siendo candidatas adecuadas para muchas aplicaciones en medicina regenerativa e ingeniería de tejidos. Sin embargo, una de las limitantes para la aplicación clínica de estas células, es contar con una masa celular crítica que permita un adecuado tratamiento. Ante ello, surge la interrogante de cómo criopreservarlas, manteniendo a su vez, la viabilidad y el potencial de diferenciación luego de un ciclo de congelación. El uso de compuestos que tengan propiedades criopreservantes ha mostrado ser un prerequisite para el éxito de un proceso de congelación. Idealmente, un medio para criopreservar SVF-AC debe tener una baja toxicidad y lograr una alta viabilidad celular sin disminuir el potencial de diferenciación. En nuestro laboratorio, luego de criopreservar SVF-AC utilizando dimetilsulfóxido (DMSO) 10%, no logramos obtener tasas de viabilidad descritas en la literatura.

Nuestra hipótesis es que una combinación de un medio basal (medio DMEM/F12 con rojo fenol) suplementado con DMSO, trehalosa y albúmina humana puede mejorar significativamente las tasas de recuperación celular post criopreservación, en comparación con medios que utilizan sólo DMSO. En el presente trabajo, medimos la tasa de viabilidad celular post criopreservación de SVF-AC obtenidas de 5 pacientes utilizando medios definidos y libres de suero bovino: DMSO 10%; DMSO 10% + Trehalosa 7,6%; DMSO 10% + Albúmina humana 10% y DMSO 10% + Trehalosa 7,6% + Albúmina humana 10%; mediante ensayo metabólico midiendo absorbancia (MTT) e integridad de membranas cuantificado por citometría de flujo con yoduro de propidio (PI). Los resultados obtenidos nos demuestran que no existen diferencias estadísticamente significativas en las tasas de viabilidad de SVF-AC posterior a un ciclo de criopreservación a diferentes niveles, desde el punto de vista metabólico con el ensayo de MTT, y a nivel de estructura de membrana por marcación de PI por citometría de flujo. Sin embargo, se observa una tendencia a mejorar la tasa de recuperación de células vitales al agregar albúmina humana. Por otro lado no se lograron obtener tasas de viabilidad tan altas como las reportadas por otros autores. Se discuten las posibles causas y se proponen alternativas para estudiarlas.

En conclusión, podemos decir que no existe ninguna condición estudiada que sea superior a las demás en cuanto a rendimiento. Es así como en respuesta a la hipótesis de trabajo podemos afirmar que la criopreservación de las SVF-AC en un medio que combine DMEM/F12 con DMSO 10% + Trehalosa 7,6% + Albúmina humana 10% no logra una tasa de recuperación de células vitales significativamente mayor que aquellas congeladas sólo con DMSO 10%.

ABSTRACT

Adipose tissue has different functions such as mechanical protection, energy reserve, endocrine function, etc. In recent years has been documented its use as abundant and accessible source of multipotent stromal cells for regenerative medicine. Currently, a standardized protocol comprises processing adipose tissue with enzymatic digestion (collagenase) and then rescue the stromal vascular fraction (SVF). This is sown in a plastic matrix suitable for cell cultures to yield a subset of elongated cells to adhere to the culture plate (SVF-AC), allowing the appearance of an adherent cell population called "stromal cells derived from adipose tissue". Several studies have shown that they maintain their ability to differentiate into multiple cell types (endo, meso and ectodermal), being suitable candidates for many applications in regenerative medicine and tissue engineering. However, one of the limitations for the clinical application of these cells is to have a critical cell number to provide an adequate treatment. In response, the question is how to cryopreserve them, while maintaining the viability and differentiation potential after a freeze cycle. Use of compounds with cryoprotective properties have shown to be a prerequisite for the success of a freezing process. Ideally, a cryoprotectant for SVF-AC must have low toxicity and achieve high cell viability without decreasing the differentiation potential. In our laboratory, after SVF-AC cryopreservation using 10% dimethyl-sulfoxide (DMSO) it is unable for us to obtain the viability rates reported in the literature. Our hypothesis is that a combination of a basal medium (DMEM / F12 medium with phenol red) supplemented with DMSO, trehalose and human albumin, can significantly improve cell recovery rates after cryopreservation compared to using only DMSO. In this

study, we measured the rate of cell viability after cryopreservation of SVF-AC obtained from 5 patients using a defined and serum-free medium: 10% DMSO; 10% DMSO + 7.6% Trehalose; 10% DMSO + 10% human albumin and 10% DMSO + 7.6% Trehalose + 10% human albumin; by measuring absorbance with a metabolic assay (MTT) and membrane integrity quantified by flow cytometry with propidium iodide (PI). The results show us that there are no statistically significant differences in rates of SVF-AC viability after a cryopreservation cycle at different levels, from a metabolic point of view with the MTT assay, and membrane structure level with IP by flow cytometry. However, a tendency is observed to improve the recovery rate of vital cells by adding human albumin. On the other hand we could not get viability rates as high as those reported by other authors. Possible causes are discussed and proposed alternatives for study.

In conclusion, we can say that there were not a studied condition better than others in terms of efficiency. Thus, in response to the working hypothesis we can say that the cryopreservation of the SVF-AC in a medium that combines DMEM / F12 with 10% DMSO + 7.6% Trehalose + 10% human albumin fails in obtaining a significantly higher recovery rate of vital cells than those frozen with only 10% DMSO.

INTRODUCCIÓN

Del tejido adiposo a las células de la fracción vascular estromal

La obesidad y el sobrepeso han aumentado dramáticamente en los últimos años lo que ha llevado a un incremento en los procedimientos para disminuir la grasa corporal, como son las abdominoplastías y lipoaspiraciones. Si bien el tejido adiposo rutinariamente se ha manejado como material de desecho, cirujanos plásticos y otros investigadores han documentado su uso como fuente abundante y accesible de células estromales multipotenciales para medicina regenerativa(1). Se ha reportado desde los años 60' que las células estromales, similares a las encontradas en la médula ósea, pueden ser aisladas del tejido adiposo mediante técnicas reproducibles, a través de una digestión enzimática(2,3). Luego de la neutralización de dichas enzimas, los elementos liberados definidos como fracción vascular estromal (SVF), se separan de los adipocitos maduros mediante centrifugación. La SVF consiste en una población heterogénea de células mesenquimáticas que incluyen no sólo células madres estromales del tejido adiposo/hematopoyético y células progenitoras, sino además células endoteliales, eritrocitos, fibroblastos, linfocitos, monocitos/macrófagos y pericitos, entre otras(4-9).

La fracción vascular estromal (SVF) y las células madres derivadas del tejido adiposo

Cuando las células de la SVF se siembran en un cultivo, un subgrupo de células elongadas comienzan a adherirse a la placa. Estas células pueden ser además purificadas mediante una combinación de lavados sucesivos, seguidos de expansión

celular en un medio similar al utilizado en células madres mesenquimáticas (MSCs) derivadas de la médula ósea, lo que permite eliminar del cultivo de la mayor parte de las células hematopoyéticas de la SVF. Este proceso permite la selección de una población celular adherente denominada “células estromales derivadas del tejido adiposo” (ADSCs)(9). Estas ADSCs, si bien son menos heterogéneas que las células de la SVF, no son de ninguna manera homogéneas. Se caracterizan por presentar marcadores estromales positivos (>90%) como CD13, CD73 y CD90; y marcadores hematopoyéticos negativos (<2%) como CD11b y CD45(9).

Aunque las ADSCs se han llamado “pre-adipocitos”(10,11), diversos estudios han demostrado que éstas mantienen su capacidad de diferenciación en múltiples tipos celulares incluyendo osteoblastos, condrocitos, adipocitos, miocitos y neuronas, luego de una expansión in-vitro(1,3,12,13) (Figura 1).

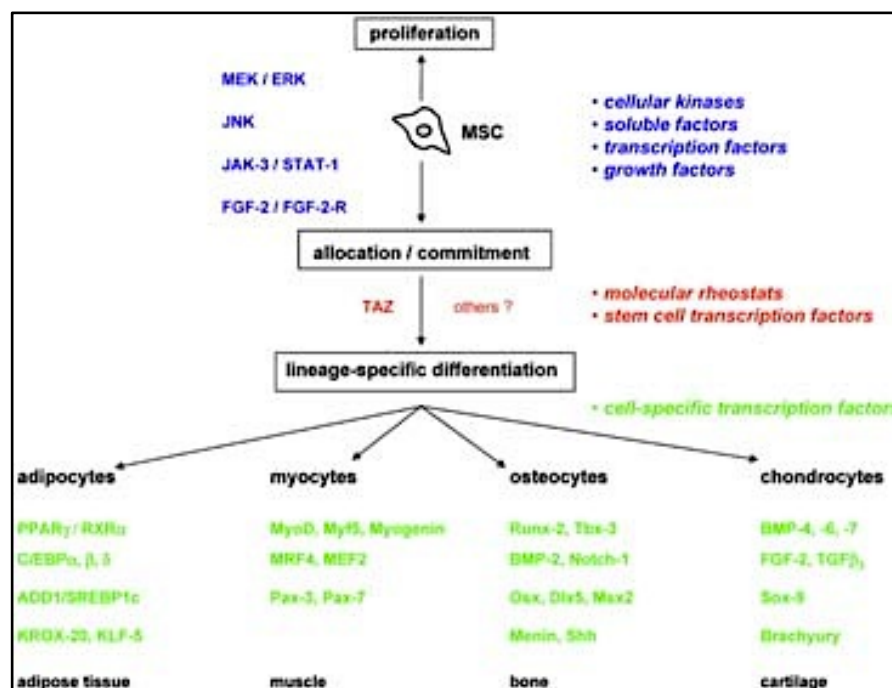


Figura 1. Capacidad de diferenciación de las ADSCs. (*Stem Cells. 2007; 25:818–827*)

Por lo anterior, estas células se han renombrado como células madres derivadas de tejido adiposo (ASCs, "Adipose Stem Cell")(6). Dado que el tejido adiposo permite extracciones de grandes volúmenes con baja morbilidad, este tejido se presenta actualmente como una interesante fuente de obtención de células madres, de fácil acceso y con volúmenes de tejido considerables.

Las ASCs han probado ser candidatas adecuadas para muchas aplicaciones en medicina regenerativa e ingeniería de tejidos(13), tales como defectos y trastornos óseos, enfermedades cardiovasculares, trastornos neurológicos, enfermedades autoinmunes, así como para mejorar el resultado del trasplante de médula ósea y de órganos sólidos(14,15).

¿Cómo se pueden obtener y preservar las ASCs?

El tejido adiposo es abundante y constituye una reserva fácilmente accesible de células madres adultas tejido específicas, ya que pueden obtenerse a través de un procedimiento mínimamente invasivo, de corta duración, bajo anestesia local, de manera ambulatoria, con poco dolor postoperatorio y escasa morbimortalidad asociada. En un estudio, se demostró que la SVF corresponde a un 60,7% del total de grasa lipoaspirada (excluyendo fibroblastos y células sanguíneas), obteniéndose aproximadamente 3.600 células/mm³, de las cuáles 23,2% corresponden a ASCs(16). Un tema que surge con respecto al almacenamiento y preservación de estas células para la posterior aplicación en clínica, es el método de criopreservación y la mantención del potencial de diferenciación de las ASCs luego de un ciclo de congelación(17). La comprensión de las características biológicas durante el almacenamiento y post-descongelación de estas células es esencial en la

investigación preclínica y clínica para asegurar la preservación de sus propiedades(18).

Por lo tanto, el desarrollo de protocolos efectivos de almacenamiento para células adherentes de la SVF y células madres adultas, aumentará su uso y utilidad en la aplicación en ingeniería de tejidos. Actualmente, se definen tres técnicas básicas de almacenamiento; a) congelación (criopreservación), b) desecación (anhidrobiosis), y c) secado por congelación (liofilización), siendo la criopreservación la técnica más efectiva para la preservación de las células.

¿Qué efectos tiene la criopreservación sobre las células?

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

El daño producido por la criopreservación, típicamente se debe a(19-22):

- Injuria osmótica o tóxica debido a la adición de CPAs que son necesarios para disminuir el daño por congelación.
- Injuria por enfriamiento asociado a la disminución de la temperatura desde la ambiental a la de cambio de fase (formación de hielo).
- Injuria por congelación asociada con la formación de hielo extra e intracelular.
- Daño por descongelación asociado al aumento de la temperatura desde su almacenamiento en nitrógeno líquido a la temperatura ambiental.

No obstante lo anterior, la criopreservación ha mostrado ser el protocolo más eficiente en cuanto a recuperación celular post-almacenamiento y es ampliamente utilizada.

¿Cómo actúa la criopreservación?

La utilización de bajas temperaturas para preservar material biológico es conocido desde hace tiempo, y una vez congelados, éstos pueden soportar el almacenamiento a bajas temperaturas por un período muy largo de tiempo.

A grandes rasgos, la criopreservación tiene como objetivo disminuir o detener completamente la progresión del envejecimiento y la actividad celular. Las principales razones para el éxito del almacenamiento por congelación son(23):

- A la temperatura del nitrógeno líquido (aproximadamente -196°C) no ocurren reacciones térmicamente guiadas en un sistema acuoso
- El agua en estado líquido no existe bajo -130°C . El estado de cristales que existe tiene una alta viscosidad ($>10^3$ poise) por lo que la difusión no es significativa.

Existen tres variables claves que determinan la respuesta de las células al proceso de criopreservación y restauración tras su estado de congelación: a) velocidad a la cual las células son congeladas, b) tipo y concentración de los agentes crioprotectores utilizados, c) velocidad a la cual las células son descongeladas para restaurarlas, tras su estado de congelación.

Durante la criopreservación, al llegar a -5°C las células y el medio circundante se mantienen descongelados debido al proceso de “*supercooling*”¹ y a la disminución del punto de congelación por los crioprotectores. Entre -5 y -15°C se forma hielo extracelular, mientras que el agua *supercooled* a nivel intracelular es transportada fuera de la célula dado su alto potencial químico(24-26). Si el enfriamiento ocurre a

¹ Proceso mediante el cual se disminuye la temperatura de un líquido o gas bajo su punto de congelación sin llevarlo a estado sólido

una velocidad lo suficientemente lenta, la célula es capaz de perder agua rápidamente por exosmosis; con lo cual ésta se deshidrata, evitando así la congelación intracelular.

Se ha estimado que debiera existir una velocidad de enfriamiento óptima. Ello se debe a que la sobrevivencia es consecuencia de dos factores inversamente dependientes de éste parámetro. Las células enfriadas rápidamente y que desarrollan congelación intracelular son más sensibles al calentamiento lento que al rápido, debido a que éste da tiempo para que pequeños cristales se agreguen formando grandes cristales (re-cristalización), llevando al daño y muerte celular(27,28). Por otro lado, las células que se enfrían lentamente para prevenir la formación de hielo intracelular, no muestran esta sensibilidad(25). Otra explicación para la sensibilidad al calentamiento rápido que presentan las células congeladas lentamente, es que se induce un tipo de shock osmótico. Existe evidencia que una cantidad de crioprotector adicional difunde dentro de la célula durante la congelación lenta (carga de soluto). Por ende, cuando la descongelación es rápida, no hay tiempo suficiente para que el exceso de aditivo difunda al exterior, llevando a edema y lisis celular.

¿Qué estrategias de criopreservación existen?

Se han descrito en la literatura 5 estrategias de criopreservación(29); a) congelación ultra-rápida, b) congelación con velocidad controlada, c) congelación con polímeros no penetrantes, d) vitrificación, y e) congelación en equilibrio. En general, la congelación con velocidad controlada es ampliamente utilizada en el almacenamiento a largo plazo de células mamíferas. Usando una baja concentración

de CPAs, se minimiza el efecto tóxico potencial de estos agentes y se facilita su remoción o dilución de la suspensión luego de la descongelación.

Para las células a criopreservar es importante que se seleccionen durante la fase exponencial de crecimiento en su nivel óptimo de viabilidad, para así asegurar la máxima tasa de sobrevivencia durante el proceso de congelación-descongelación.

¿De qué manera actúan los criopreservantes?

Partiendo con la observación fortuita de Polge y cols.(22) en los años 40', el uso de productos químicos en el medio de congelación han mostrado ser un prerrequisito para el resultado exitoso de un proceso de almacenamiento por congelación.

Como se mencionó anteriormente, el medio ideal para criopreservar ASCs es aquel que sea no tóxico y que logre una mayor viabilidad celular sin disminuir el potencial de diferenciación. Es así como la elección y la composición de un medio óptimo de criopreservación es un área de intensa investigación en el campo de la criobiología.

Los productos químicos que presentan y/o confieren algún grado de crioprotección, varían desde solutos que difunden con un bajo peso molecular como dimetilsulfóxido (DMSO), glicerol, etilenglicol (EG); hasta solutos que no difunden con un alto peso molecular como polivinilpirrolidona (PVP), hidroxietil-almidón (HES), metilcelulosa (MC)(30-33). La naturaleza exacta y el grado de crioprotección entregado por estos productos químicos a un tipo celular específico es aún tema de suposición y es comprendido sólo parcialmente(34,35). Sin embargo, algunas posibles explicaciones serían:

- Mejoría en las propiedades coligativas de las soluciones con CPAs(36-39).
- Modificación de las propiedades de transporte de la membrana celular(38-41).

- Prevención de la denaturación de membranas por la elevada concentración de sales extracelulares a baja temperatura(42-44).
- Formación de una cobertura protectora en membranas plasmáticas sensibles(45-47).
- Prevención de la siembra intracelular de agua *supercooled* y así, de la formación de hielo intracelular perjudicial(48-50).
- La habilidad de CPAs de alterar las propiedades físicas de las soluciones durante la congelación más que algún efecto directo en las membranas celulares(51-55).

¿De qué depende la efectividad de los criopreservantes?

La efectividad de cualquier CPAs depende de los siguientes factores: 1) debe ser altamente soluble en agua, aún a bajas temperaturas de manera de permitir la disminución del punto de congelación, 2) debe ser capaz de penetrar la célula, y 3) debe ser atóxico para las células a las concentraciones requeridas.

Para la mayoría de la células, se utiliza 5-10% DMSO como crioprotector en el medio de congelación. El DMSO tiene la ventaja de penetrar rápidamente a la célula, sin ser tan tóxico como el glicerol. Ambos CPAs tienen un gran volumen molar comparado a otros solutos de bajo peso molecular como sales y azúcares, por lo que ocupan un volumen proporcionalmente mayor dentro de la célula comparado con sales intracelulares de cualquier osmolaridad. Por lo tanto, como la célula pierde agua hacia el hielo extracelular, el mayor tamaño del crioprotector intracelular pospondrá la reducción de volumen celular a una temperatura más baja. También se sabe que el DMSO induce la formación temporal de poros en la membrana celular, los cuales disminuyen el estrés en la membrana durante la contracción y edematización celular.

Sin embargo, a altas concentraciones, el DMSO interactúa con lípidos de la bicapa de la membrana conduciéndola a la pérdida de su integridad(56). Dado que este efecto es inversamente proporcional a la temperatura, se debe minimizar la exposición de DMSO a temperaturas más cálidas(57).

Efecto de algunos CPAs en la viabilidad celular

Se han hecho algunas observaciones del efecto de varios criopreservantes en la viabilidad de ASCs post-congelación-descongelación(58).

- La viabilidad de ASCs criopreservadas con el medio control que contenía 80% plasma con 10% DMSO en DMEM fue 83%.
- El porcentaje más alto de supervivencia celular post-descongelación se encontró en células congeladas en DMEM con 2-10% DMSO (80-88%) y los valores más bajos se encontraron tanto con DMEM con 40% PVP como con 1% PVP (5%), DMEM con 0% DMSO (25%), y en DMEM con 1% MC y 10% suero humano o 10% suero fetal bovino (40%).
- La congelación de ASCs en ausencia de DMSO fue deletéreo para la supervivencia celular.
- La viabilidad post-descongelación con 1% MC en DMEM (47%) es significativamente menor a la obtenida con DMEM con 1% MC y 10% DMSO (80%).
- El uso de 1% y 40% PVP en DMEM provoca una pérdida dramática de viabilidad celular (5%), mientras que el uso de 10% PVP produce una viabilidad máxima de 65%. Sin embargo, la viabilidad de ASCs disminuye cuando la concentración de PVP aumentaba de 10% a 20%, pero no es estadísticamente significativo.

Thirumala y cols.(59), utilizando citometría de flujo, demostraron que se puede lograr una viabilidad de hasta 87% con un medio de congelación libre de suero (humano o bovino), utilizando DMSO 10%. Esta viabilidad es mayor a la obtenida con menores concentraciones de DMSO (2, 4, 6 y 8%), cuando se combinaba con metilcelulosa o con suero fetal bovino o humano. En otro trabajo, este mismo autor mostró similares resultados de viabilidad en medios que utilizaban DMSO comparados con PVP 10% (63 vs 54)(60). Esto se condice con estudios que demuestran que existe una factibilidad técnica y que la morfología e integridad de membrana son comparables en medios de criopreservación libres de suero homo y heterólogos, utilizando sólo DMSO como criopreservante, tanto en ASCs como en otras células progenitoras humanas(61).

La sericina, proteína de la seda rica en serina, tiene efectos crioprotectores y estimula la proliferación celular en medios de cultivo, tanto en bacterias(62) como en células de mamíferos(63,64). Recientemente se describió su utilidad como criopreservante en ASCs, obteniéndose viabilidad de hasta 95% post-descongelación con método de exclusión de *Trypan Blue*(65). Otros CPAs, como azúcares, se han utilizado en la criopreservación de células adiposas(66) y glóbulos rojos(67), entre otras. Entre estos CPAs está la trehalosa, un disacárido no reductor de la glucosa que no difunde a través de la membrana y con el cual se han logrado mejorar los resultados de viabilidad(26). Se encuentra en altas concentraciones en organismos que son capaces de sobrevivir a la deshidratación. Su efecto estaría asociado una disminución del agua intracelular mediante un efecto osmótico que disminuiría la formación de hielo intracelular. Además, tiene propiedades vitrificantes que disminuye la formación de cristales a bajas temperaturas, establece interacciones

protectoras con los lípidos de membrana y estabiliza proteínas durante la congelación-descongelación(66,68).

¿Qué otros factores influyen en la viabilidad celular?

Además de los CPAs, el vehículo que se utiliza es importante para la criopreservación. Se puede utilizar un medio de cultivo, plasma autólogo o heterólogo, entre otros. Habitualmente, se utiliza un medio de cultivo con DMEM/F12, que en el caso de células del estroma mesenquimático como ASCs, tiene buen rendimiento(69). Se puede agregar además suero bovino y proteínas como albúmina, ya que estos tienen la ventaja de mejorar el control de pH y protección contra el daño por congelación(70).

Otro factor que afecta la viabilidad de las células post-descongelación es la concentración de ASCs en el medio de criopreservación. Goh y cols.(71) determinaron mediante técnicas de dilución límite, la concentración óptima de ASCs que maximizaba la viabilidad celular, manteniendo además un potencial de diferenciación estable. Esta concentración fue $0,5 \times 10^6$ cél/ml de medio de criopreservación, obteniendo un 81,1% de viabilidad utilizando el método de exclusión con *Trypan Blue*.

Considerando todo lo anteriormente expuesto, nuestra línea de trabajo es contar algún día con la posibilidad de aplicar en clínica las ASCs para medicina regenerativa. Para esto se deben generar protocolos que optimicen la tasa de viabilidad post-criopreservación sin necesidad de utilizar criopreservantes que contengan proteína animal. El DMSO es uno de los CPA con mejor rendimiento en

cuanto a tasa de viabilidad post-criopreservación. Los resultados prometedores obtenidos con trehalosa en criopreservación de tejido adiposo y ASCs, hacen suponer que la combinación de ambos optimizarían el proceso. La albúmina humana, por su parte, mejoraría el control de pH y protegería a las ASCs contra el daño por congelación.

En nuestro Laboratorio de Cultivo de Tejidos y Terapia Celular, no hemos logrado reproducir las mismas tasas de viabilidad reportada por otros autores utilizando DMSO 10%. Actualmente contamos con la disponibilidad de DMSO, trehalosa y albúmina humana, por lo que se nos hace necesario evaluar estos CPAs en un medio libre de suero bovino, de manera de mejorar la viabilidad y generar un protocolo universal con componentes definidos, que optimice la viabilidad de las células adherentes de la SVF (SVF-AC) post-descongelación para su posterior uso en clínica.

HIPÓTESIS

La criopreservación de las SVF-AC en un medio que combine DMEM/F12 con DMSO 10% + Trehalosa 0,2M + Albúmina humana 10%, resultará en una tasa de recuperación de células vitales significativamente mayor que aquellas congeladas sólo con DMSO.

OBJETIVOS GENERALES

Medir la tasa de viabilidad celular antes y después de un ciclo de criopreservación de SVF-AC mediante ensayos de MTT y citometría de flujo.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.- Obtención de muestras de SVF-AC de 5 pacientes de sexo femenino, sin comorbilidad asociada, entre 20 y 45 años de edad.
- 2.- Medición de tasas de viabilidad justo antes e inmediatamente después un ciclo de criopreservación mediante ensayos de MTT y Ioduro de Propidio por citometría de flujo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Pacientes y muestra

Se utilizó grasa fresca tejido celular subcutáneo de la pared abdominal de 5 pacientes lipoaspiradas de manera electiva en el Hospital Clínico de la Universidad de Chile. Se utilizaron como criterios de inclusión pacientes de sexo femenino, entre 20 a 45 años de edad, con índice de masa corporal (IMC) inferior a 28 kg/mt² y sin comorbilidades asociadas. Se excluyen pacientes de sexo masculino, con comorbilidades, IMC mayor a 28, que tomen medicamentos, fumadores y menores de 20 o mayores de 45 años de edad.

Se obtuvo la autorización de cada paciente mediante un consentimiento informado escrito (Anexo 1), aprobado por el Comité de Ética Científico de la misma Institución (Anexo 2).

El tamaño muestral se calculó mediante la siguiente fórmula, en la cual se considera que un grupo es su propio control(72):

$$N = [(Z\alpha + Z\beta)^2 DEd^2] / dif^2$$

$$Z\alpha=1,96 \quad Z\beta=0,84 \quad DEd=20 \quad dif=25$$

$$N= (1,96+0,84)^2DEd^2/ dif^2$$

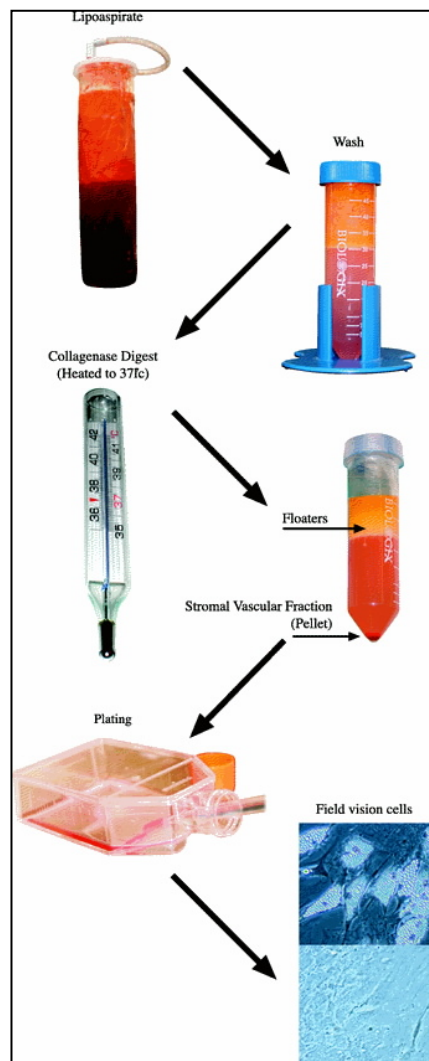
$$N=7,84*400/625 = 5$$

Obtención de la SVF-AC

Las muestras se procesaron dentro de las 6 horas de ser extraídas de los pacientes. Se utilizó 100 ml de grasa fresca y se lavó tres veces con 100 ml de PBS a temperatura ambiente para remover eritrocitos y leucocitos.

Se rescató el tejido adiposo sobrenadante y se resuspendió en un volumen equivalente de DMEM/F12 con collagenasa tipo I 0,1%. La solución se incubó en un baño a 37°C, con agitación continua durante 90 minutos. Luego de esto, la solución se centrifugó a 600G por 20 minutos a temperatura ambiente para separar los adipocitos maduros de la SVF. Se aspiró el sobrenadante quedando el pellet que corresponde a la SVF que contiene ASCs. La SVF se resuspendió con pipeta P1000 en 5 ml del medio de cultivo estándar utilizado en nuestro laboratorio (DMEM/F12 + 10%SFB + gentamicina + ciprofloxacino (0,5 mg/100 ml) + voriconazol (50ul/100ml)) y se sembró en placas de cultivo de 100 mm de diámetro para expansión celular (Figura 2).

Figura 2. Procesamiento del tejido lipoaspirado y aislamiento de ASCs. (*Circ Res.* 2007;100(9):1249-60)



Se expandieron las células realizando subcultivos (1:2) cuando se alcanzaba el 80% de confluencia. La técnica utilizada en cada placa de 100 mm a subcultivar fue:

- Se retira medio y se lava con 4 ml de PBS por 3 veces.
- Se agrega 2 ml de tripsina 0.02% y se incuba por 5 minutos a 37°C.
- Se frena la reacción con 2 ml de medio completo.
- Se homogeniza la muestra y se traspasa a tubos de 15 ml para centrifugar a 2000 rpm por 10 minutos.
- Se descarta el sobrenadante, se agregan 10 ml de medio completo y se resuspende.
- Subcultivo 10 ml en dos placas de 100 mm y dejo en incubadora a 37°C y 5% de CO². El proceso se repite en cada subcultivo.

Se realizó un panel de inmunofenotipificación mediante citometría de flujo con muestras de SVF-AC que utilizamos en nuestro laboratorio, en el subcultivo 3 y considerando 20.000 eventos por marcador, como control de calidad correspondiente a la utilización de estas células(9,79).

Proceso de criopreservación

La criopreservación se llevó a cabo entre los subcultivos 2-3 (dentro de la fase exponencial de crecimiento). Una vez alcanzada la cantidad celular necesaria (4,5 a 5 millones de células aproximado), se liberaron las células de la misma forma que para un subcultivo, se realizó conteo con *Trypan Blue* en cámara de Neubauer y se rescató una muestra de $0,5 \times 10^6$ cél/ml para criopreservarla en un medio vehículo (DMEM/F12 con rojo fenol) con diferentes combinaciones de agentes

criopreservantes. El control se realizó con medio vehículo sin CPAs. Las condiciones de criopreservación fueron las siguientes:

- 1) DMSO 10% (1,5 M) (medio habitual)
- 2) DMSO 10% (1,5 M) + Trehalosa 7,6% (0,2 M)
- 3) DMSO 10% (1,5 M) + Albúmina humana 10%
- 4) DMSO 10% (1,5 M) + Trehalosa 7,6% (0,2 M) + Albúmina humana 10%

Se utilizó una técnica de baja complejidad y costo-efectiva para llevar los criotubos a -80°C de manera semi-controlada. Para este fin, se utilizó un receptáculo con isopropil alcohol que produce una disminución de la temperatura a una velocidad aproximada de $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ (Figura 3) (Thermo Scientific Nalgene Mr. Frosty) y está ampliamente validado en la literatura(73,74). Al día siguiente se los criotubos se cambiaron a nitrógeno líquido para ser almacenados hasta su utilización. Al las 4 semanas se descongelaron en un baño a 37°C (1 minuto) y se realizaron los ensayos de viabilidad.

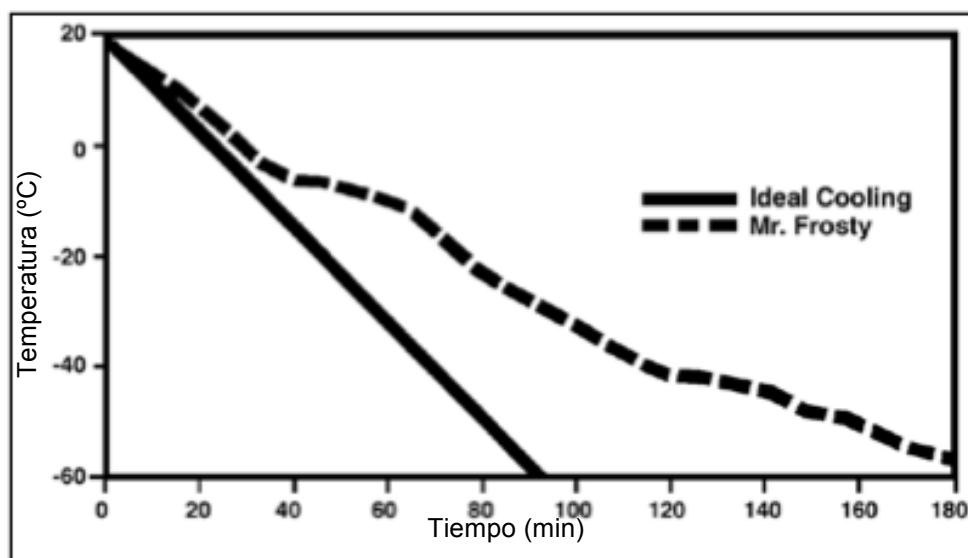


Figura 3. Velocidad de congelación ideal y velocidad entregada por Mr.Fosty (Thermo Scientific Nalgene and Nunc Cryopreservation Guide. 2009)

Ensayos de viabilidad

Justo antes e inmediatamente después de un ciclo de criopreservación, se realizaron los ensayos de viabilidad (MTT y Ioduro de Propidio por Citometría de Flujo) en células adherentes de la SVF.

El protocolo utilizado para descongelar los criotubos fue el siguiente:

- Luego de 4 semanas de criopreservación, se descongelan los criotubos en un baño a 37°C (1 a 1,5 minutos).
- Una vez descongelados, se lavan las células de CPAs con 3 ml de medio completo.
- Se homogeniza la muestra y se traspasa a tubos de 15 ml para centrifugar a 2000 rpm por 10 minutos.
- Descarta el sobrenadante, se agrega 2 ml de medio completo y resuspende.
- Se realiza conteo en cámara de Neubauer para utilizar la cantidad de células necesarias para cada ensayo.

- *Ensayo colorimétrico con MTT(76-78):*

Es un método sensible, cuantitativo y seguro que mide viabilidad, proliferación y metabolismo celular. Se basa en la capacidad de la enzima deshidrogenasa mitocondrial de las células vivas, de reducir el sustrato amarillo soluble en agua 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil bromuro de tetrazolium (MTT) a un producto formazan azul oscuro/morado insoluble en agua. La cantidad de formazan producido es directamente proporcional al número de células vitales.

Durante el diseño del estudio, se realizaron curvas de calibración de la técnica para definir el número de células a incubar por pocillo (1.000, 5.000, 10.000, 50.000 células) (Figura 4) y tiempo de incubación (30, 60, 120, 240, 360 minutos) (Figura 5).

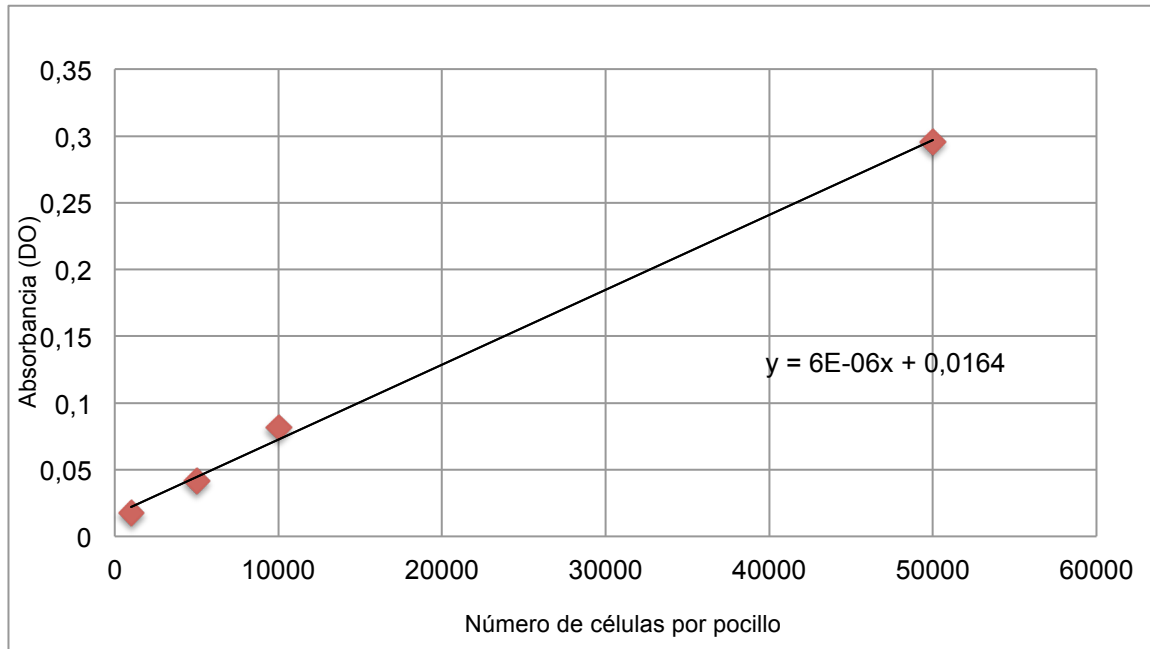


Figura 4. Curva de calibración para ensayo de MTT en la cual se observa absorbancia (DO) vs cantidad de células por pocillo (1.000, 5.000, 10.000, 50.000 células).

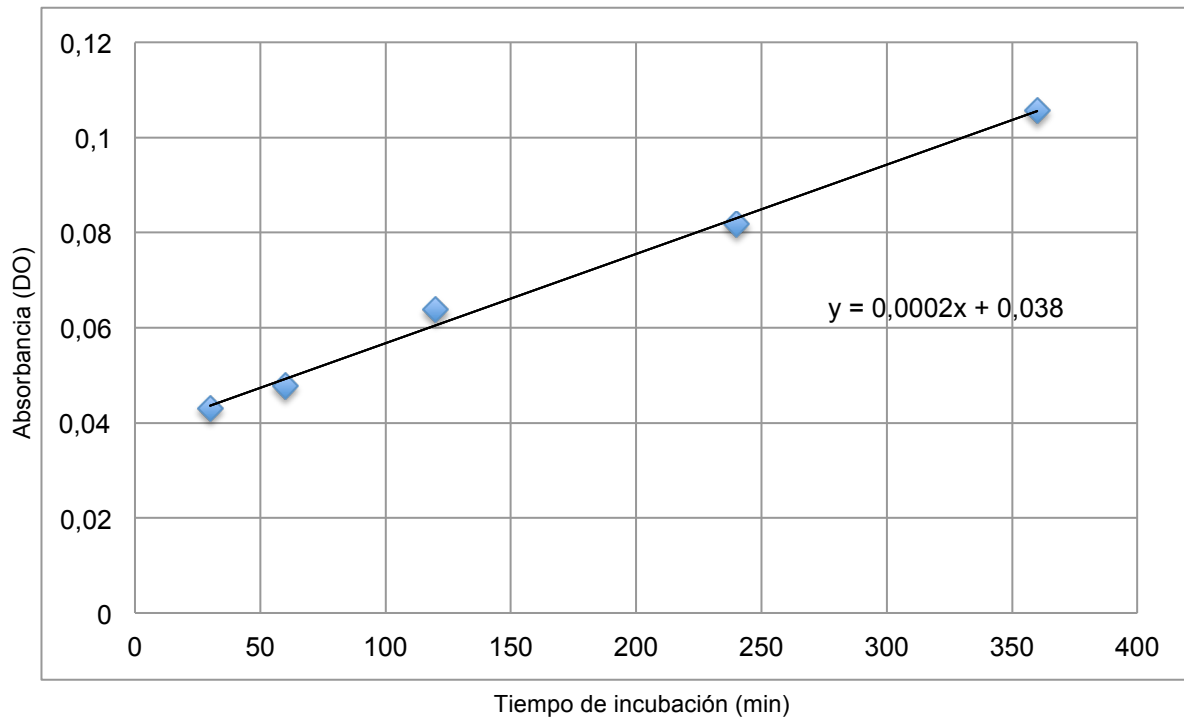


Figura 5. Curva de calibración para ensayo de MTT en la cual se observa absorbancia (DO) vs tiempo de incubación de 10.000 células por pocillo (30, 60, 120, 240, 360 minutos).

Una vez definido que se incubarán 10.000 células por pocillo durante 240 minutos, se realizaron los ensayos de viabilidad. El protocolo utilizado fue el siguiente:

- Se siembran las células en una placa de 96 pocillos, en las cuatro condiciones de criopreservación (21 pocillos por condición) y el control sin CPAs (7 pocillos). Se sembraron 10.000 células en cada pocillo.
- Se incuban durante 12 hrs placas de 96 pocillos a 37°C y CO₂ 5%.
- Se preparan 6 ml de MTT en DMEM/F12 sin rojo fenol a 5 mg/ml. Se diluye en DMEM/F12 sin rojo fenol 1:8.

- Se retira placa de la incubadora y se aspira el sobrenadante cuidadosamente. Se agregan 80 ul del MTT preparado en cada pocillo con células. Se incuba cada placa por 240 minutos a 37°C. (Figura 6A)
- Al cabo del período de tiempo transcurrido, se aspira MTT cuidadosamente de las placas con células. Se lava con 80 ul de PBS, se observa en el microscopio y se vuelve a aspirar. (Figura 6B)
- Se agregan 50 ul de isopropil alcohol en los pocillos con células para diluir el MTT reducido (color violeta). En los 5 pocillos sin células se agregan 50 ul de isopropil alcohol para realizar la medición de su absorbancia (blanco).
- Se homogeniza con pipeta (P100) y se realiza lectura de la densidad óptica (DO) con detector de ELISA.

El porcentaje de viabilidad se obtiene mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Viabilidad} = \frac{\text{DO células criopreservadas} - \text{blanco}}{\text{DO células precriopreservación} - \text{blanco}} \times 100$$

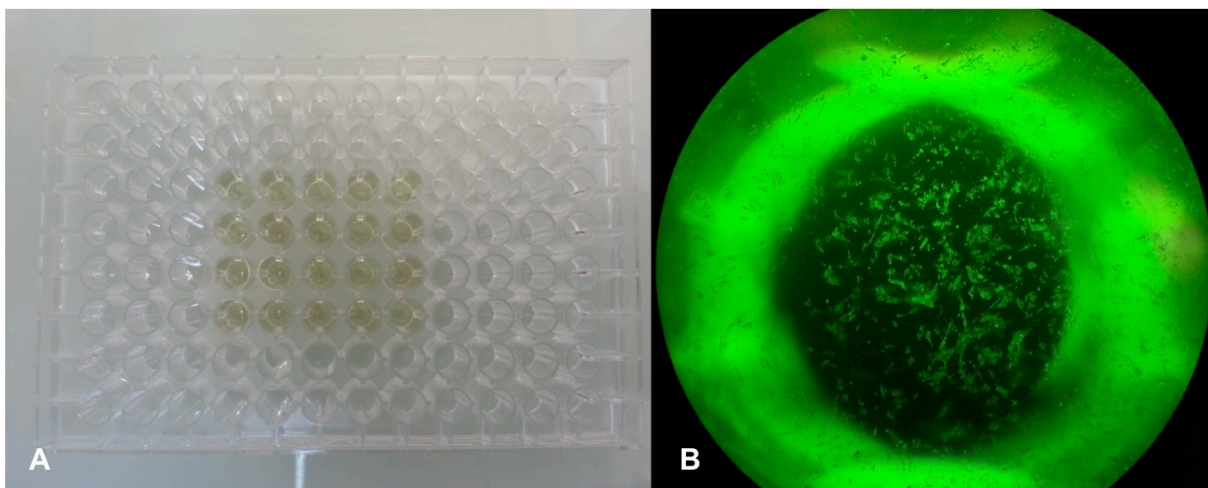


Figura 6. A) Placa de 96 pocillos con MTT previo a la incubación; B) Visualización de células adheridas en un pocillo luego de 240 minutos de incubación.

- *Ioduro de Propidio por citometría de flujo*

Se determinó la viabilidad celular con citometría de flujo cuantitativa antes y después de un ciclo de criopreservación en cada condición. Para ésto se cargaron tubos para citometría de flujo con 200 uL de suspensión celular ($0,5 \times 10^6$ cél/ml), tres tubos por condición (12 tubos). Como controles se utilizaron células necróticas inducida por metanol(59) (1 tubo) y células vivas no criopreservadas (1 tubo). Se utilizó el marcador Ioduro de Propidio (PI), mezclando la suspensión celular con 2 uL de PI antes de la adquisición de datos por el citómetro. La tinción celular con PI indica que se ha alterado la integridad de la membrana plasmática, por lo que indica que las células son necróticas y las distinguen de las células vivas. La citometría, por lo tanto, mostrará dos poblaciones celulares: Vivas (PI-negativas) y necróticas (PI-positivas). Las células se analizaron mediante el sistema de citometría de flujo Becton-Dickinson, considerando 40.000 eventos como significativos.

La tasa de viabilidad obtenida mediante citometría de flujo con PI se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Tasa viabilidad (\%)} = \frac{\text{Viabilidad post-criopreservación}}{\text{Viabilidad pre-criopreservación}} \times 100$$

Análisis estadístico

Todos los datos se expresan en promedio \pm desviación estándar (promedio \pm SD). El análisis estadístico se realizó comparando las diferentes condiciones de criopreservación entre sí, utilizando ANOVA y un test no paramétrico (Tukey's Test) con el programa inerSTAT 1.3. Se consideró un *p value* $< 0,05$ como estadísticamente significativo.

RESULTADOS

Se obtuvieron células adherentes de la SVF (SVF-AC), derivadas del tejido adiposo lipoaspirado, en cinco pacientes que cumplieron con los criterios de inclusión. El panel de inmunofenotipificación fue compatible con SVF-AC. (Anexo 3)

- ***Viabilidad obtenida mediante el Ensayo colorimétrico con MTT***

La lectura de la densidad óptica (DO) del ensayo colorimétrico con MTT se realizó mediante ELISA a una longitud de onda de 570 nm. Las tasas de viabilidad obtenidas mediante el ensayo colorimétrico con MTT en las diferentes condiciones se observan en la Figura 7.

Al realizar un análisis estadístico comparando las diferentes condiciones de criopreservación entre sí, utilizando ANOVA y un test no paramétrico (Tukey's Test), se obtiene que no hay diferencias estadísticamente significativas en la tasas de viabilidad medidas con MTT luego de un ciclo de criopreservación con diferentes combinaciones de CPAs (Condiciones 1, 2, 3, 4).

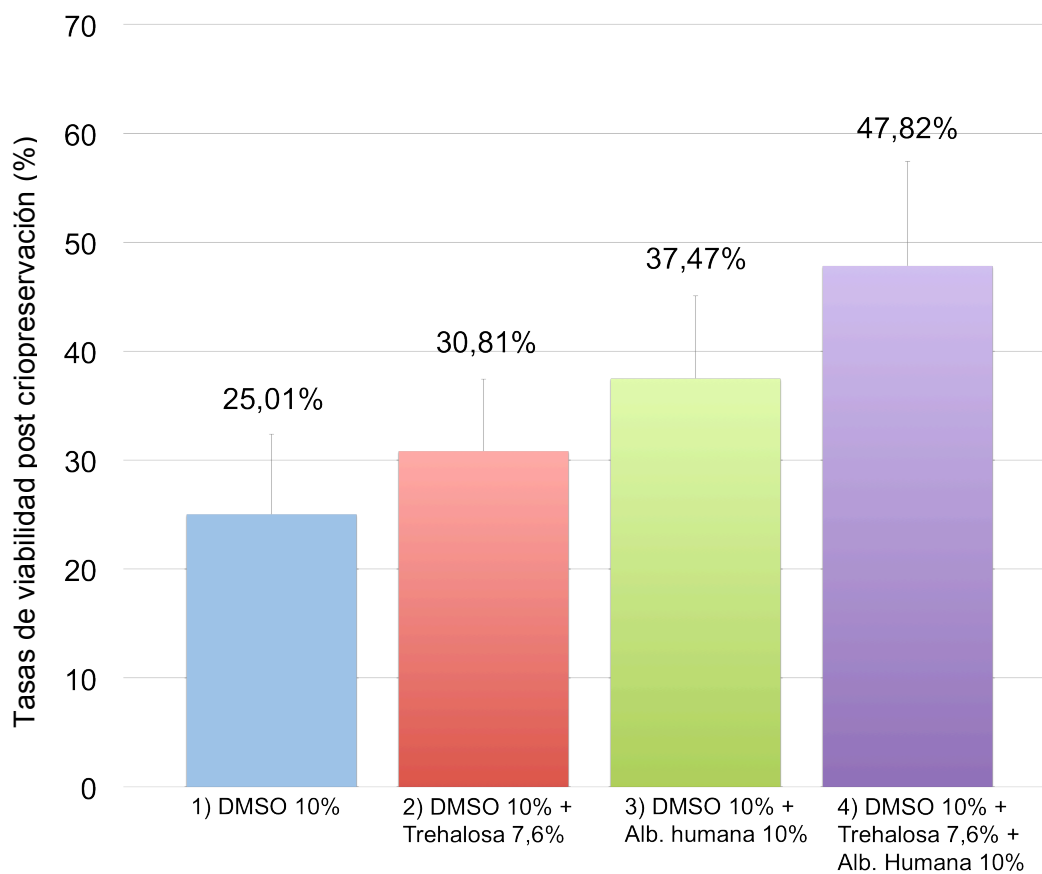


Figura 7. Gráfico en que se observan las tasas de viabilidad post criopreservación (%) obtenidas mediante el ensayo colorimétrico con MTT en las diferentes condiciones.

- **Viabilidad obtenida con Ioduro de Propidio por citometría de flujo**

Se midió la viabilidad de las SVF-AC de cada paciente mediante citometría de flujo con Ioduro de Propidio (PI). En la Figura 8 se observan histogramas obtenidos del control negativo (células necróticas), control positivo (células vivas), precriopreservación y post criopreservación.

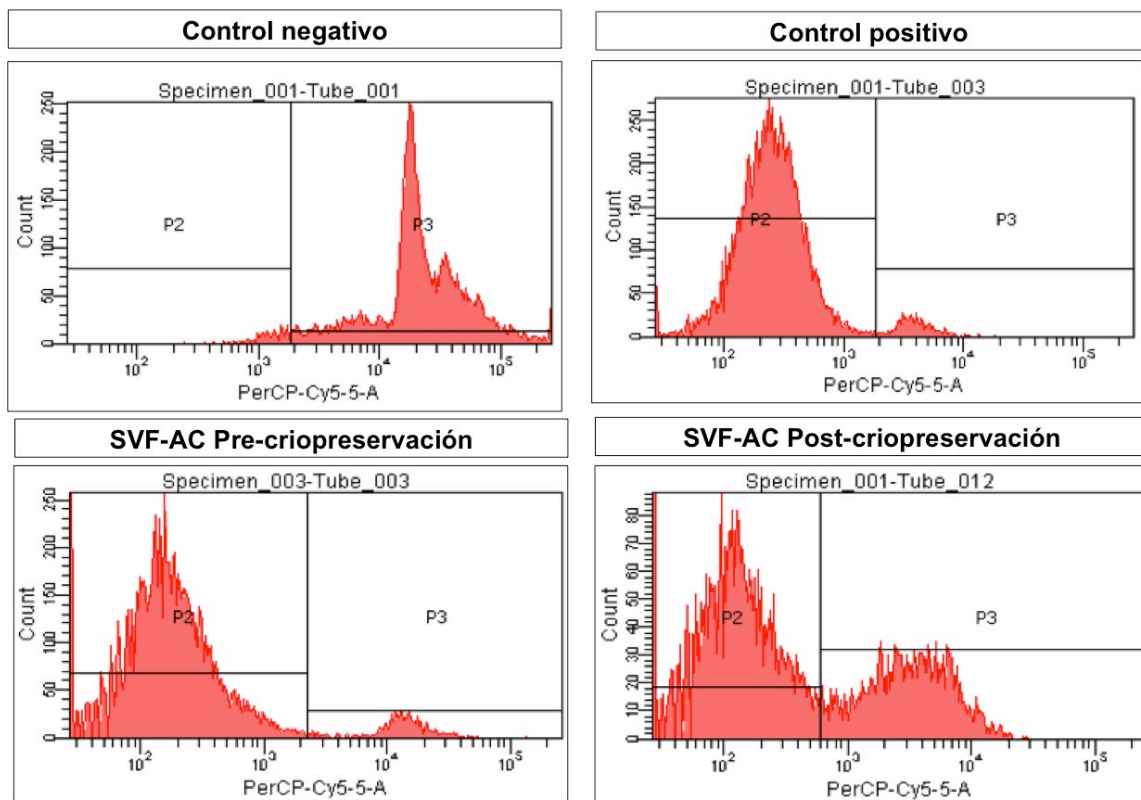


Figura 8. Ejemplo de histogramas obtenido con PI por citometría de flujo; células de control negativo (metanol), control positivo (células vivas), previo a un ciclo de criopreservación, y posterior a éste en alguna de las condiciones.

Las tasas de viabilidad y mortalidad obtenidas con PI en las diferentes condiciones se observan en la Figura 9 y 10, respectivamente.

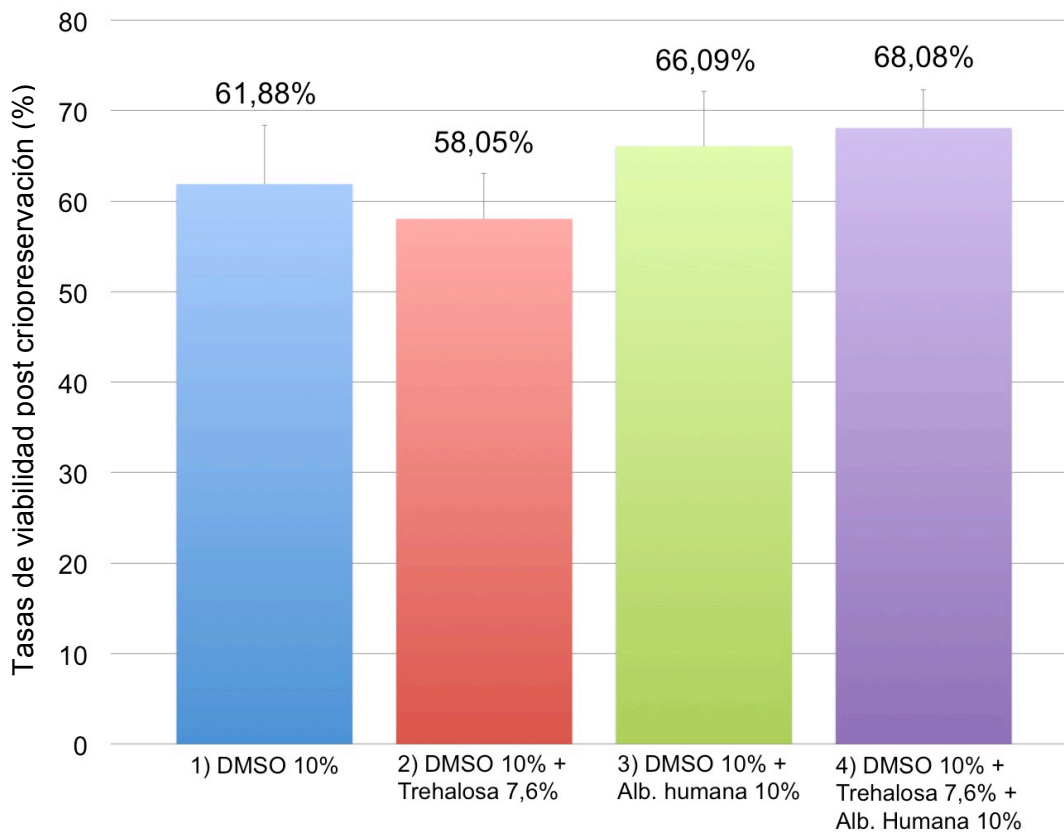


Figura 9. Gráfico en que se observan las tasas de viabilidad post criopreservación (%) obtenidas mediante PI por citometría de flujo en las diferentes condiciones.

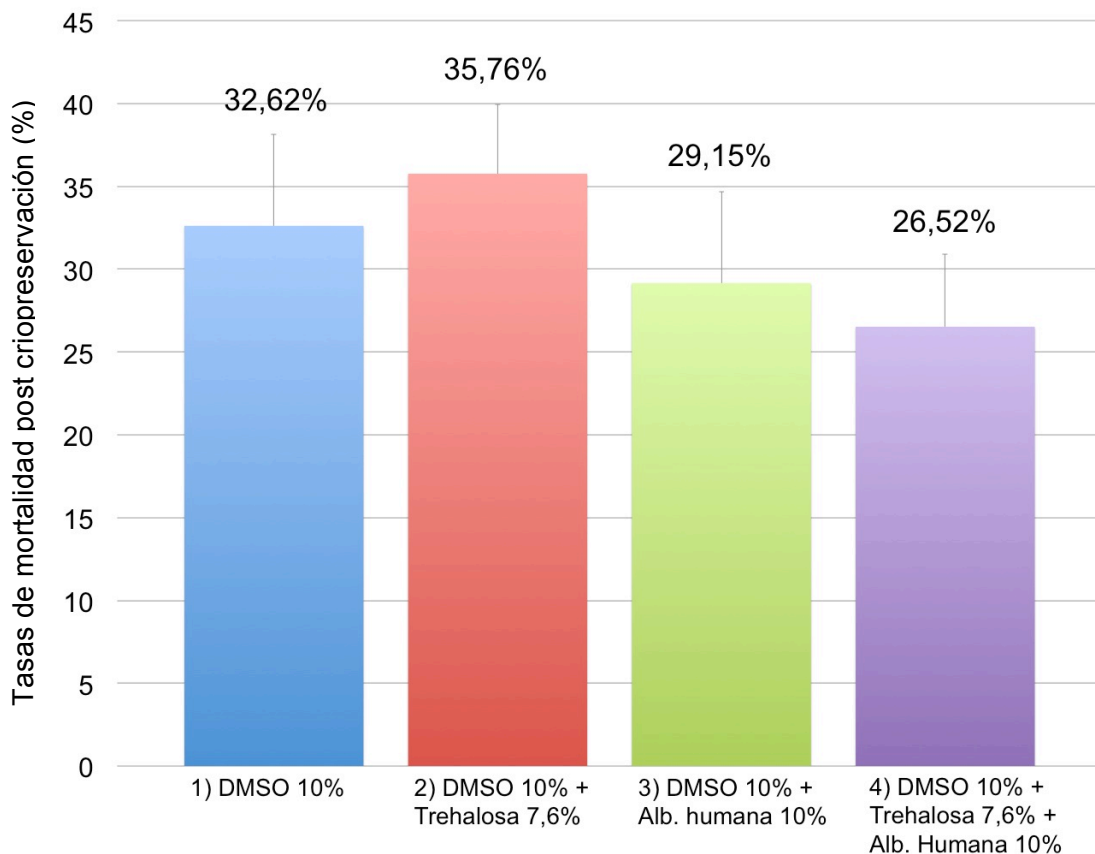


Figura 10. Gráfico en que se observan las tasas de mortalidad post criopreservación (%) obtenidas mediante PI por citometría de flujo en las diferentes condiciones.

Al analizar las tasas de viabilidad y mortalidad en cada condición de CPAs y comparándolas entre sí mediante ANOVA, se concluye que ningún medio tiene mejor rendimiento ya que no hay diferencias significativas entre ellos ($p = 0.50394$).

El análisis de la viabilidad mediante el ensayo de MTT y citometría de flujo con PI, previo y posterior a un ciclo de criopreservación, demuestra que no existe ninguna condición estudiada que estadísticamente sea superior a las demás en cuanto a rendimiento.

DISCUSIÓN

El uso de productos químicos en el medio de congelación, que partió como una observación fortuita de Polge(22) en los años 40', ha mostrado hoy en día ser un requisito para el resultado exitoso de un proceso de criopreservación. Los productos químicos que confieren algún grado de crioprotección, varían desde solutos que difunden con un bajo peso molecular hasta solutos que no difunden por su un alto peso molecular. El medio ideal para criopreservar ASCs es aquel que sea no tóxico y que logre una mayor viabilidad celular sin disminuir el potencial de diferenciación. Está descrito que la combinación de CPAs en el medio de criopreservación podría lograr mayores tasas de vitalidad(58).

La optimización los resultados en el proceso de criopreservación de tejido adiposo(80,81) y ASC(82) al agregar trehalosa, no no se vio reflejado en nuestros resultados. Es posible que el efecto sinérgico descrito para la trehalosa no se observe a concentraciones de DMSO 10%. De Rosa et al.(82) evaluando el efecto de diferentes CPAs sobre la viabilidad de ASC, concluye que el efecto óptimo criopreservante se logra con DMSO 4%, trehalosa 6% y suero fetal bovino (SFB) 90%. Otro estudio, recientemente publicado, demuestra que se obtienen mayores tasas de viabilidad al utilizar DMSO 5% comparado con trehalosa 0,25M, y que no se obtienen mayores tasas al combinar DMSO 5% con diferentes concentraciones SFB, concluyendo que el CPA ideal es DMSO 5%(83). En nuestro caso, la razón de no lograr mejores tasas de vitalidad al combinar trehalosa con DMSO 10% probablemente radica en el hecho que el efecto final de ambos CPAs de disminuir la formación de hielo intracelular mediante distintos mecanismos es redundante.

Una forma de optimizar la viabilidad posterior a un ciclo de criopreservación es agregando SFB a la solución de CPAs. Se han logrado tasas de viabilidad mayores a 80% cuando se usa FBS a concentraciones de 90%(82) o 95%(84), en asociación a DMSO 4% + Trehalosa 6% o DMSO 5%, respectivamente. El problema de utilizar FBS es que existe el riesgo de transmisión de enfermedades virales o por priones y la ocurrencia de rechazo inmunogénico.

Estudios recientes han logrado reemplazar el FBS por plasma humano autólogo (HP) en el protocolo de criopreservación (DMSO 5% + HP 95%) logrando tasas similares de viabilidad, todas mayores al 80% analizadas con *Trypan Blue*(84). El plasma humano autólogo tiene la desventaja de ser un medio no definido en cuanto a su composición y ser variable inter e intrapersonal, con respecto al sexo, edad, estados patológicos etc.(85). El uso de plasma autólogo sería intercambiable por albúmina humana 5% como criopreservantes en asociación a DMSO 7,5%, en *stem cells* derivadas de sangre periférica(86). Esto nos hace suponer que nos aproximaría al medio ideal definido y libre de proteína animal. En nuestros resultados existe una mayor tasa de viabilidad post criopreservación al agregar albúmina humana, que si bien no es significativa, muestra una tendencia que podría estar explicada por el efecto de la albúmina mediante otro mecanismo probablemente mejorando el control del pH(70).

La baja tasa de viabilidad posterior a 4 semanas de criopreservación, no puede ser explicada por el tiempo en que se almacenaron las SVF-AC en nitrógeno líquido (aproximadamente -196°C). Se ha observado que estas células mantienen tasas de viabilidad >80% luego de 1 y 6 meses, cayendo sólo al 70% al año de criopreservación(82), sin embargo, mantienen su capacidad de diferenciación y el

fenotipo de los marcadores de superficie. Otro factor que podría haber influido en las tasas de viabilidad post criopreservación obtenidas es la velocidad a la cual las células son congeladas. La velocidad controlada ($1^{\circ}\text{C}/\text{min}$) tiene mejores resultado en la criopreservación de células mamíferas(26). El descenso controlado de la temperatura permite que se forme hielo extracelular mientras el agua *supercooled* se transporta fuera de la célula, así logrando la vitrificación del medio intracelular. A velocidades más lentas, se genera daño es producto de un aumento de la concentración de solutos intracelulares a medida que el agua sale de la célula llegando a la deshidratación. Por el contrario, a velocidades más rápidas el agua no alcanza a salir de la célula y se genera hielo intracelular que produce la ruptura de la membrana(26). La utilización de un sistema semi-controlado o no automático podría exponer a las células a velocidades mayores o menores a la ideal durante el proceso de congelación, provocando una disminución en las tasas de viabilidad cuando se compara con sistemas automatizados de disminución de la temperatura.

Si bien, nuestro rendimiento en cuanto a viabilidad post criopreservación es inferior al reportado por otros autores(58,59), la evaluación de estas tasas habitualmente se realiza mediante una técnica poco precisa, como es la exclusión con *Trypan Blue*(65,84). Se ha descrito que ésta técnica tiende a sobreestimar la viabilidad, por ejemplo; un 90% de células descongeladas se excluyen con esta prueba (viables), sin embargo, sólo un 60% demuestra ser capaz de adherirse a las 24 hrs(65). La medición de la viabilidad utilizando técnicas más precisas como PI por citometría de flujo y MTT son una estrategia más adecuada para enfrentar esta interrogante, ya que evalúa la viabilidad mediante dos métodos diferentes: a) Integridad de la membrana plasmática y nuclear; b) Actividad metabólica de una enzima. PI evalúa la

etapa final de la muerte celular, por lo que células inviables no impactan la mortalidad. Por otro lado MTT mide la actividad de deshidrogenasa mitocondrial sólo en las células que se adhieren a la placa al incubarlas por 12 hrs, descartando la evaluación de las células que no fueron capaces de adherirse y se aspiran en el proceso. Así mismo, cambios en la actividad metabólica puede alterar los resultados respecto al número de células vitales(87).

Es así como en respuesta a la hipótesis de trabajo podemos afirmar que la criopreservación de las SVF-AC en un medio que combine DMEM/F12 con DMSO 10% + Trehalosa 0,2M + Albúmina humana 10% no resulta en una tasa de recuperación de células viables significativamente mayor que aquellas congeladas sólo con DMSO 10%, en lo cual pueden influir diversos factores previamente discutidos.

Llama la atención, que aún utilizando combinaciones de CPAs se obtuvieron tasas de vitalidad relativamente menores en todas las condiciones (60-70%) comparado a lo descrito en la literatura (alrededor de 85-95%)(58,59,65,84). El desafío ahora para nuestro Laboratorio es intentar esclarecer las variables que podrían haber influido en este proceso mediante estudios de criopreservación con un sistema de descenso automatizado de la temperatura, a través de la utilización de diferentes combinaciones de CPAs; ya sea disminuyendo la concentración de DMSO para evitar mecanismos redundantes o incorporando otros CPAs como la sericina que han mostrado tasas de viabilidad de ASCs alentadoras post criopreservación(65). Además sería interesante conocer las características de las células descongeladas en cuanto a su capacidad de adherirse y expandirse en la placa, formar colonias y diferenciarse en diferentes tipos celulares.

CONCLUSIONES

El análisis mediante el dos ensayos que evalúan la viabilidad de SVF-AC posterior a un ciclo de criopreservación a diferentes niveles, desde el punto de vista metabólico el MTT y a nivel estructural el PI por citometría de flujo, nos hace concluir que ninguna condición estudiada es superior a las demás en cuanto a rendimiento. Es así como en respuesta a la hipótesis de trabajo podemos afirmar que la criopreservación de las SVF-AC en un medio que combine DMEM/F12 con DMSO 10% + Trehalosa 0,2M + Albúmina humana 10% no logra una tasa de recuperación de células vitales significativamente mayor que aquellas congeladas sólo con DMSO 10%.

BIBLIOGRAFÍA

1. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, et al. Human adipose tissue is a source of multi-potent stem cells. *Mol Biol Cell*. 13:4279-4295, 2002.
2. Gimble J, Guilak F. Adipose-derived adult stem cells: isolation, characterization, and differentiation potential. *Cytotherapy*. 5:362-369, 2003
3. Gimble JM, Katz AJ, Bunnell BA. Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circ Res*. 100:1249-1260, 2007.
4. Cawthorn WP, Scheller EL, MacDougald OA. Adipose tissue stem cells meet preadipocyte commitment: going back to the future. *J Lipid Res*. 53:227-2246, 2012.
5. McIntosh K, Zvonic S, Garrett S, Mitchell JB, Floyd ZE, Hammill L, et al. The immunogenicity of human adipose derived cells: temporal changes in vitro. *Stem Cells*. 24:1245-1253, 2006.
6. Mitchell JB, McIntosh K, Zvonic S, Garrett S, Floyd ZE, Kloster A, et al. Immunophenotype of human adipose derived cells: temporal changes in stromal- and stem cell-associated markers. *Stem Cells*. 24:376-385, 2006.
7. Cousin B, Andre M, Arnaud E, Penicaud L, Casteilla L. Reconstitution of lethally irradiated mice by cells isolated from adipose tissue. *Biochem Biophys Res Commun*. 301:1016-1022, 2003.
8. Han J, Koh YJ, Moon HR, Ryoo HG, Cho CH, Kim I, et al. Adipose tissue is an extramedullary reservoir for functional hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood*. 115: 957-964, 2010.

9. Bourin P, Bunnell BA, Casteilla L, Dominici M, Keith AJ, et al. Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics (IFATS) and Science and the International Society for Cellular Therapy (ISCT). *Cytotherapy*, 15:641-648, 2013.
10. Deslex S, Negrel R, Vannier C, Etienne J, Ailhaud G. Differentiation of human adipocyte precursors in a chemically defined serum-free medium. *Int J Obes*. 11:19-27, 1987
11. Hauner H, Entenmann G, Wabitsch M, Gaillard D, Ailhaud G, Negrel R, Pfeiffer EF. Promoting effect of glucocorticoids on the differentiation of human adipocyte precursor cells cultured in a chemically defined medium. *J Clin Invest*. 84:1663-1670, 1989.
12. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng*. 7:211-228, 2001.
13. Guilak F, Lott KE, Awad HA, Cao Q, Hicok KC, Fermor B, Gimble JM. Clonal analysis of the differentiation potential of human adipose-derived adult stem cells. *J Cell Physiol*. 206:229-237, 2006.
14. Nathan S, Das De S, Thambyah A, Fen C, Goh J, Lee EH. Cell-based therapy in the repair of osteochondral defects: a novel use for adipose tissue. *Tissue Eng*. 9:733-744, 2003.
15. Schäffler A, Büchler C. Concise review: adipose tissue-derived stromal cells-basic and clinical implications for novel cell-based therapies. *Stem Cells*. 25:818-827, 2007.

16. Eto H, Suga H, Matsumoto D, Inoue K, Aoi N, Kato H, Araki J, Yoshimura K. Characterization of structure and cellular components of aspirated and excised adipose tissue. *Plast Reconstr Surg.* 124:1087-1097, 2009.
17. Yong KW, Pinguan-Murphy B, Xu F, Abas WA, Choi JR, Omar SZ, Azmi MA, Chua KH, Safwani WK. Phenotypic and Functional Characterization of Long-Term Cryopreserved Human Adipose-derived Stem Cells. *Sci Rep.* 5:9596, 2015.
18. Devireddy RV, Thirumala S, Gimble JM. Cellular response of adipose derived passage-4 adult stem cells to freezing stress. *J Biomech Eng.* 127:1081-1086, 2005.
19. Pegg DE. Mechanisms of freezing damage. *Symp Soc Exp Biol.* 41:363-378, 1987.
20. Pegg DE. Principles of cryopreservation. *Methods Mol Biol.* 368:39-57, 2007.
21. Bischof JC, Rubinsky B. Large ice crystals in the nucleus of rapidly frozen liver cells. *Cryobiology.* 30:597-603, 1993.
22. Venkatasubramanian RT, Grassl ED, Barocas VH, Lafontaine D, Bischof JC. Effects of freezing and cryopreservation on the mechanical properties of arteries. *Ann Biomed Eng.* 34:823-832, 2006.
23. Seth G. Freezing mammalian cells for production of biopharmaceuticals. *Methods.* 56:424-431, 2012.
24. Toner M, Cravalho EG, Karel M. Cellular response of mouse oocytes to freezing stress: prediction of intracellular ice formation. *J Biomech Eng.* 1993;115(2):169-74.
25. Mazur P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. *Am. J. Physiol.* 247:125-142, 1984.
26. Shu Z, Gao D, Pu LL. Update on Cryopreservation of Adipose Tissue and Adipose-derived Stem Cells. *Clin Plast Surg.* 42:209-218, 2015.

27. Seki S, Mazur P. Effect of warming rate on the survival of vitrified mouse oocytes and on the recrystallization of intracellular ice. *Biol. Reprod.* 79:727-737, 2008.
28. Farrant J, Walter CA, Lee H, McGann LE. Use of two-step cooling procedures to examine factors influencing cell survival following freezing and thawing. *Cryobiology.* 14:273-286, 1977.
29. Meryman HT. Cryopreservation of living cells: principles and practice. *Transfusion.* 47:935-945, 2007.
30. McGrath JJ. Quantitative measurement of cell membrane transport: technology and applications. *Cryobiology.* 34:315-334, 1997.
31. Anchordoguy TJ, Cecchini CA, Crowe JH, Crowe LM. Insights into the cryoprotective mechanism of dimethyl sulfoxide for phospholipid bilayers. *Cryobiology.* 28:467-473, 1991.
32. Anchordoguy T, Carpenter JF, Loomis SH, Crowe JH. Mechanisms of interaction of amino acids with phospholipid bilayers during freezing. *Biochim Biophys Acta.* 946:299-306, 1988.
33. Yu ZW, Quinn PJ. Dimethyl sulphoxide: a review of its applications in cell biology. *Biosci Rep.* 14:259-281, 1994.
34. Fahy GM, Lilley TH, Linsdell H, Douglas MS, Meryman HT. Cryoprotectant toxicity and cryoprotectant toxicity reduction: in search of molecular mechanisms. *Cryobiology.* 27:247-268, 1990.
35. Fahy GM. The relevance of cryoprotectant "toxicity" to cryobiology. *Cryobiology.* 23:1-13, 1986.
36. Farrant J. Is there a common mechanism of protection of living cells by polyvinylpyrrolidone and glycerol during freezing? *Nature.* 222:1175-1176, 1969.

37. Shaw JM, Kuleshova LL, MacFarlane DR, Trounson AO. Vitrification properties of solutions of ethylene glycol in saline containing PVP, Ficoll, or dextran. *Cryobiology*. 35:219-229, 1997.
38. Hey JM, MacFarlane DR. Crystallization of ice in aqueous solutions of glycerol and dimethyl sulfoxide 2: ice crystal growth kinetics. *Cryobiology*. 37:119-130, 1998.
39. Thirumala S, Gimble JM, Devireddy RV. Transport phenomena during freezing of adipose tissue derived adult stem cells. *Biotechnol Bioeng*. 92:372-383, 2005.
40. Kardak A, Leibo SP, Devireddy R. Membrane transport properties of equine and macaque ovarian tissues frozen in mixtures of dimethylsulfoxide and ethylene glycol. *J Biomech Eng*. 129:688-694, 2007.
41. Li G, Saenz J, Godke RA, Devireddy RV. Effect of glycerol and cholesterol-loaded cyclodextrin on freezing-induced water loss in bovine spermatozoa. *Reproduction*. 131:875-86, 2006.
42. Meryman HT. Freezing injury and its prevention in living cells. *Annu Rev Biophys Bioeng*. 3:341-363, 1974.
43. Meryman HT. Mechanics of freezing in living cells and tissues. *Science*. 124:515-521, 1956.
44. Connor W, Ashwood-Smith MJ. Cryoprotection of mammalian cells in tissue culture with polymers; possible mechanisms. *Cryobiology*. 10:488-496, 1973.
45. Holt WV, North RD. Effects of temperature and restoration of osmotic equilibrium during thawing on the induction of plasma membrane damage in cryopreserved ram spermatozoa. *Biol Reprod*. 51:414-424, 1994.

46. Barrios B, Pérez-Pé R, Gallego M, Tato A, Osada J, Muiño-Blanco T, Cebrián-Pérez JA. Seminal plasma proteins revert the cold-shock damage on ram sperm membrane. *Biol Reprod.* 63:1531-1537, 2000.
47. De Leeuw FE, De Leeuw AM, Den Daas JH, Colenbrander B, Verkleij AJ. Effects of various cryoprotective agents and membrane-stabilizing compounds on bull sperm membrane integrity after cooling and freezing. *Cryobiology.* 30:32-44, 1993.
48. Barnard T. Rapid freezing techniques and cryoprotection of biomedical specimens. *Scanning Microsc* 1:1217-1224, 1987.
49. Hirsh AG, Williams RJ, Meryman HT. A novel method of natural cryoprotection: intracellular glass formation in deeply frozen populus. *Plant Physiol.* 79:41-56, 1985.
50. Rall WF, Mazur P, McGrath JJ. Depression of the ice-nucleation temperature of rapidly cooled mouse embryos by glycerol and dimethyl sulfoxide. *Biophys J.* 41:1-12, 1983.
51. Fahy GM. Analysis of "solution effects" injury. Equations for calculating phase diagram information for the ternary systems NaCl-dimethylsulfoxide-water and NaCl-glycerol-water. *Biophys J.* 32:837-850, 1980.
52. Guignon B, Aparicio C, Otero L, Sanz PD. Prediction of ice content in biological model solutions when frozen under high pressure. *Biotechnol Prog.* 25:454-460, 2009.
53. Morris GJ, Goodrich M, Acton E, Fonseca F. The high viscosity encountered during freezing in glycerol solutions: effects on cryopreservation. *Cryobiology.* 52:323-334, 2006.
54. Watson PF, Duncan AE. Effect of salt concentration and unfrozen water fraction on the viability of slowly frozen ram spermatozoa. *Cryobiology.* 25:131-142, 1988.

55. Shepard ML, Goldston CS, Cocks FH. The H₂O-NaCl-glycerol phase diagram and its application in cryobiology. *Cryobiology*. 13:9-23, 1976.
56. Gurtovenko AA, Anwar J. Modulating the Structure and Properties of Cell Membranes: The Molecular Mechanism of Action of Dimethyl Sulfoxide. *J Phys Chem B*. 111:10453–60, 2007.
57. Anchoroguy TJ, Carpenter JF, Crowe JH, Crowe LM. Temperature-dependent perturbation of phospholipid bilayers by dimethylsulfoxide. *Biochim Biophys Acta*. 1104:117–122, 1992.
58. Gimble JM, Bunnell BA. Adipose-derived stem cells. Chapter 9 "Methods for the purification and characterization of human adipose-derived stem cells". Springer. 109-120, 2011.
59. Thirumala S, Gimble JM, Devireddy RV. Evaluation of methylcellulose and dimethyl sulfoxide as the cryoprotectants in a serum-free freezing media for cryopreservation of adipose-derived adult stem cells. *Stem Cells Dev*. 19:513-522, 2010.
60. Thirumala S, Gimble JM, Devireddy RV. Cryopreservation of stromal vascular fraction of adipose tissue in a serum-free freezing medium. *J Tissue Eng Regen Med*. 4:224-232, 2010.
61. Zeisberger SM, Schulz JC, Mairhofer M, Ponsaerts P, Wouters G, et al. Biological and physicochemical characterization of a serum- and xeno-free chemically defined cryopreservation procedure for adult human progenitor cells. *Cell Transplant*. 20: 1241-1257, 2011.

62. Tsujimoto K, Takagi H, Takahashi M, Yamada H, Nakamori S. Cryoprotective effect of the serine-rich repetitive sequence in silk protein sericin. *J Biochem.* 129:979-986, 2011.
63. Terada S, Nishimura T, Sasaki M, Yamada H, Miki M. Sericin, a protein derived from silkworms, accelerates the proliferation of several mammalian cell lines including a hybridoma. *Cytotechnology.* 40:3-12, 2002.
64. Sasaki M, Kato Y, Yamada H, Terada S. Development of a novel serum-free freezing medium for mammalian cells using the silk protein sericin. *Biotechnol Appl Biochem.* 42:183-188, 2005.
65. Miyamoto Y, Oishi K, Yukawa H, Noguchi H, Sasaki M, Iwata H, Hayashi S. Cryopreservation of human adipose tissue-derived stem/progenitor cells using the silk protein sericin. *Cell Transplant.* 21:617-622, 2012.
66. Pu LL, Cui X, Fink BF, Cibull ML, Gao D. Cryopreservation of adipose tissues: the role of trehalose. *Aesthet Surg J.* 25:126-131, 2005.
67. Pellerin-Mendes C, Million L, Marchand-Arvier M, Labrude P, Vigneron C. In vitro study of the protective effect of trehalose and dextran during freezing of human red blood cells in liquid nitrogen. *Cryobiology.* 35:173-186, 1997.
68. Pu LL, Cui X, Fink BF, Cibull ML, Gao D. Long-term preservation of adipose aspirates after conventional lipoplasty. *Aesthet Surg J.* 24:536-541, 2004.
69. Freshney RI. Culture of animal cells. A manual of basic technique. Chapter 9. Ed Wiley. 5th Edition, 2005.
70. Morris CB. Cryopreservation of Animal and Human Cell Lines. *Methods in Molecular Biology*, vol. 368: Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols. Ed. Humana Press Inc. 2nd Edition 2007.

71. Goh BC, Thirumala S, Kilroy G, Devireddy RV, Gimble JM. Cryopreservation characteristics of adipose-derived stem cells: maintenance of differentiation potential and viability. *J Tissue Eng Regen Med.* 1:322-324, 2007.
72. Duffau G. Tamaño muestral en estudios biomédicos. *Rev. Chil. Pediatr.* 70:314-324, 1999.
73. Laboratory Technologists Committee of the adult AIDS Clinical Trials Group. Consensus protocol for PBMC cryopreservation and thawing (Version 3.0). 1-8, 2002.
74. Simione FP. Thermo Scientific Nalgene and Nunc Cryopreservation Guide. 2009.
75. Merdassi G, Mazoyer C, Guerin JF, Saad A, Salle B, Lornage J. Examination of viability and quality of ovarian tissue after cryopreservation using simple laboratory methods in ewe. *Reprod Biol Endocrinol.* 9:78, 2011.
76. Freshney RI. Culture of animal cells. A manual of basic technique. Chapter 22-23. Ed Wiley. 5th Edition 2005.
77. Vega-Avila E, Pugsley MK. An overview of colorimetric assay methods used to assess survival or proliferation of mammalian cells. *Proc West Pharmacol Soc.* 54:10-14, 2011.
78. Plumb JA, Milroy R, Kaye SB. Effects of the pH dependence of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide-formazan absorption on chemosensitivity determined by a novel tetrazolium-based assay. *Cancer Res.* 49:4435-4440, 1989.
79. Yoshimura, K., Shigeura, T., Matsumoto, D., et al. Characterization of freshly isolated and cultured cells derived from the fatty and fluid portions of liposuction aspirates. *J. Cell. Physiol.* 208:64-76, 2006.
80. Pu LL. Cryopreservation of adipose tissue. *Organogenesis.* 5:138-142, 2009.

81. Pu LL, Coleman SR, Cui XD, et al. Cryopreservation of autologous fat grafts harvested with the Coleman technique. *Ann Plast Surg* 64:333-337, 2010.
82. De Rosa A, De Francesco F, Tirino V, Ferraro GA, Desiderio V, Paino F, Pirozzi G, D'Andrea F, Papaccio G. A new method for cryopreserving adipose-derived stem cells: an attractive and suitable large-scale and long-term cell banking technology. *Tissue Eng Part C Methods*. 15:659-667, 2009.
83. Yong KW, Pingguan-Murphy B, Xu F, Abas WA, Choi JR, Omar SZ, Azmi MA, Chua KH, Safwani WK. Phenotypic and Functional Characterization of Long-Term Cryopreserved Human Adipose-derived Stem Cells. *Sci Rep*. 5:9596, 2015.
84. Zhang P, Policha A, Tulenko T, DiMuzio P. Autologous human plasma in stem cell culture and cryopreservation in the creation of a tissue-engineered vascular graft. *J Vasc Surg*. S0741-5214(14)01897-7, 2014.
85. Wang Z, Wang Y, Liu H, Che Y, Xu Y. Age-related variations of protein carbonyls in human saliva and plasma: is saliva protein carbonyls an alternative biomarker of aging? *Age*. 37:9781, 2015.
86. Smagur A, Mitrus I, Ciomber A, Panczyniak K, Fidyk W, Sadus-Wojciechowska M, Holowiecki J, Giebel S. Comparison of the cryoprotective solutions based on human albumin vs. autologous plasma: its effect on cell recovery, clonogenic potential of peripheral blood hematopoietic progenitor cells and engraftment after autologous transplantation. *Vox Sang*. 108:417-424, 2015.
87. Vega-Avila E1, Pugsley MK. An overview of colorimetric assay methods used to assess survival or proliferation of mammalian cells. *Proc West Pharmacol Soc*. 54:10-14, 2011.

ANEXOS

ANEXO 1. CONSENTIMIENTO INFORMADO



UNIVERSIDAD DE CHILE
Facultad de Medicina
Laboratorio de Cultivo de Tejidos

CONSENTIMIENTO INFORMADO: MEDIOS DE PRESERVACIÓN EN FRÍO DE CÉLULAS DERIVADAS DE LA GRASA

Nombre de Paciente:

Este formulario de consentimiento puede contener algunas palabras que usted probablemente no entiende. Por favor pida explicación a uno de los integrantes del grupo de investigación para que lo asesore.

Antes de tomar la decisión de participar en la investigación, lea cuidadosamente este formulario de consentimiento y discuta cualquier inquietud que usted tenga con el investigador. Usted también podrá discutir su participación con los demás miembros de su familia o amigos antes de tomar la decisión

Se le invita a participar en un estudio de investigación debido a que Ud. será sometida a un procedimiento electivo en que se extraerá grasa de su pared abdominal. Este estudio consiste en utilizar parte de la grasa, que habitualmente se elimina como material de desecho, para probar diferentes medios de preservación en frío (criopreservación).

DESCRIPCIÓN DEL ESTUDIO

Durante la lipoaspiración a la que Ud. será sometida, se le extraerá grasa abdominal, la cual será desechada. De ese material de desecho se tomará una muestra de 100 cc, la cual será procesada para obtener un grupo de células de la grasa necesaria para nuestra investigación (células de la fracción estromal). Este procedimiento no implica ningún cambio en la técnica quirúrgica, ni menos en los resultados, por lo que no aumenta el riesgo ni cambia los beneficios que implica dicho procedimiento.

VENTAJAS POSIBLES/PAGO POR LA PARTICIPACIÓN

Usted no se beneficiará directamente al participar en este estudio de investigación. Es posible que en el futuro se podría beneficiar del desarrollo de nuevas y mejores técnicas de criopreservación para su aplicación terapéutica. No se compensará económicamente por la participación en este estudio.

ASPECTOS COMERCIALES

Es posible que definir un medio de criopreservación con alto rendimiento en cuanto a sobrevida celular pueda tener valor para propósitos comerciales y/o intelectuales, como por ejemplo patentes. Usted no tendrá ningún derecho de propiedad y/o beneficio financiero de los productos o procedimientos desarrollados a partir de la muestra de grasa obtenida.

CONFIDENCIALIDAD

Su identidad será mantenida tan confidencial como la ley lo exige.

COSTO

No habrá costos o cargos adicionales por la participación en el estudio.

PREGUNTAS

Si Ud. tiene dudas y consultas posterior a la explicación inicial, contacte al investigador coordinador Dr. Nicolás Pereira C., F: +569 6 6169347; nicolaspereirac@gmail.com o al Dr. Pablo Caviedes F., F: +569 9 2569847; pcaviede@med.uchile.cl.

PARTICIPACIÓN VOLUNTARIA

Su participación en este estudio es voluntaria. Ud. puede retirar su consentimiento de participar en este estudio en cualquier momento previo a la lipoaspiración. Una vez que Ud. haya proporcionado la muestra, esta no podrá ser retirada del estudio. Si Ud. decide retirarse del estudio no significará cambios en su tratamiento médico. Para retirarse Ud. debe contactarse con uno de los Investigadores coordinadores, no siendo necesario explicar las razones por las cuales se retira.

LIBERACIÓN DE LA MUESTRA

Ud. autoriza a liberar parte del tejido extraído que no será necesario para los propósitos del estudio.

DECLARACIÓN DEL PARTICIPANTE

Se le ofrecerá una copia firmada de este consentimiento para mantenerlo en su expediente. Firmado este documento Ud. no renunciará a sus derechos legales, pero concuerda en que se le ha informado todo lo concerniente al estudio y que Ud. ha dado su consentimiento para participar en este.

He leído este formulario de aprobación y he tenido la oportunidad de hacer preguntas. Entiendo que me darán copia de este documento. Consiento en participar en esta investigación

Nombre del participante:

RUT..... Firma..... Fecha

Nombre del Investigador designado:

RUT..... Firma..... Fecha

Nombre del Ministro de Fe:

RUT..... Firma..... Fecha

ANEXO 2. CERTIFICADO APROBACIÓN COMITÉ DE ÉTICA



HOSPITAL CLÍNICO UNIVERSIDAD DE CHILE

SUBDIRECCION DE INVESTIGACION CLINICA

CERTIFICADO N° 592/13

La Subdirección de Investigación Clínica, certifica que el Proyecto que se individualiza a continuación fue revisado y aprobado en todas las instancias pertinentes según la normativa interna que rige en el Hospital Clínico de la Universidad de Chile.

Nombre del Proyecto

“Efectos de diferentes medios de criopreservación sobre la viabilidad de la células adherentes de la fracción vascular estromal derivadas del tejido adiposo ¿Cuál es el mejor medio crioprotector?”.

N° Interno OAIC 592/13

Investigador Principal:

Dr. Nicolás Pereira Covarrubias
Tesisista de Biomedicina y Molecular
Facultad de Medicina de la Universidad de Chile

Co-Investigador de nuestro Hospital

Dr. Carlos Sciaraffia Merino
Sub-dirección de Investigación Clínica

Financiamiento y Facturación:

Sin Financiamiento

Código Convenio: No procede

Otros Antecedentes:

1. Proyecto aprobado por el Comité de Ética del Hospital Clínico a través del Acta de Aprobación N° 24 del 17 de Julio 2013.
2. El Objetivo de este proyecto es medir la tasa de viabilidad celular antes y después de un ciclo de criopreservación de SVF-CA mediante ensayos LIVE/DEAD, MTT y citometría de flujo.
3. Proyecto cumple con lo dispuesto en la Ley 20.120 del año 2006, delegación que consta en la Resolución Exenta N° 461 del 06 de Agosto de 2013.
4. Proyecto no generará *overhead* al Hospital.



DR. CARLOS SCIARAFFIA MERINO
SUBDIRECTOR DE INVESTIGACION CLINICA

XEN

02 SET 2013

ANEXO 3. PANEL DE INMUNOFENOTIPIFICACIÓN DE 3 MUESTRAS DE SVF-AC Y GUIAS PARA CARACTERIZACIÓN DE ASCs. (Cytotherapy, 15:641-648, 2013).

Marcador	1	2	3	Criterio IFATS-ISCT
IgG1k- FITC	3.76	1.1	2.58	NA
IgG1k- PE	3.83	1.63	2.46	NA
IgG1k-AF488	3.42	0.14	0.86	NA
IgG2bk-PE	3.24	0.43	0.83	NA

CD29-PE	99.8	100	100	>80% Positivo
CD44-FITC	98.7	93.4	99.6	>80% Positivo
CD73-PE	99	99.8	99.9	>80% Positivo
CD90-FITC	99.5	97	99.7	>80% Positivo
CD105-PE	99.2	99.7	99.6	>80% Positivo

CD34-PE	22.7	14.5	4.88	2-30% Variable
---------	------	------	------	----------------

CD45-FITC	3.73	0.12	2.61	<2%
CD19-FITC	3.6	1.21	2.86	Bajo o negativo
CD11b-AF488	3.32	0.38	2.31	Bajo o negativo
HLADR-PE	2.92	3.77	2.35	Bajo o negativo

Feature	ASCs
Viability	>90% viable
Immunophenotype	<p>Primary stable positive markers: CD13, CD29, CD44, CD73, CD90, CD105 (>80% in ASC)</p> <p>Primary unstable positive marker: CD34 (present at variable levels)</p> <p>Primary negative marker: CD31, CD45, CD235a (<2%)</p> <p>Secondary other positive markers: CD10, CD26, CD36, CD49d, CD49e</p> <p>Secondary other low or negative markers: CD3, CD11b, CD49f, CD106, PODXL</p>

