

Células estromales derivadas de tejido adiposo: funciones biológicas y regenerativas

Severiano Dos Anjos Vilaboa
PhD Biologist
Scientific Consultant

Innotech
Medica



Ortopedia y Traumatología

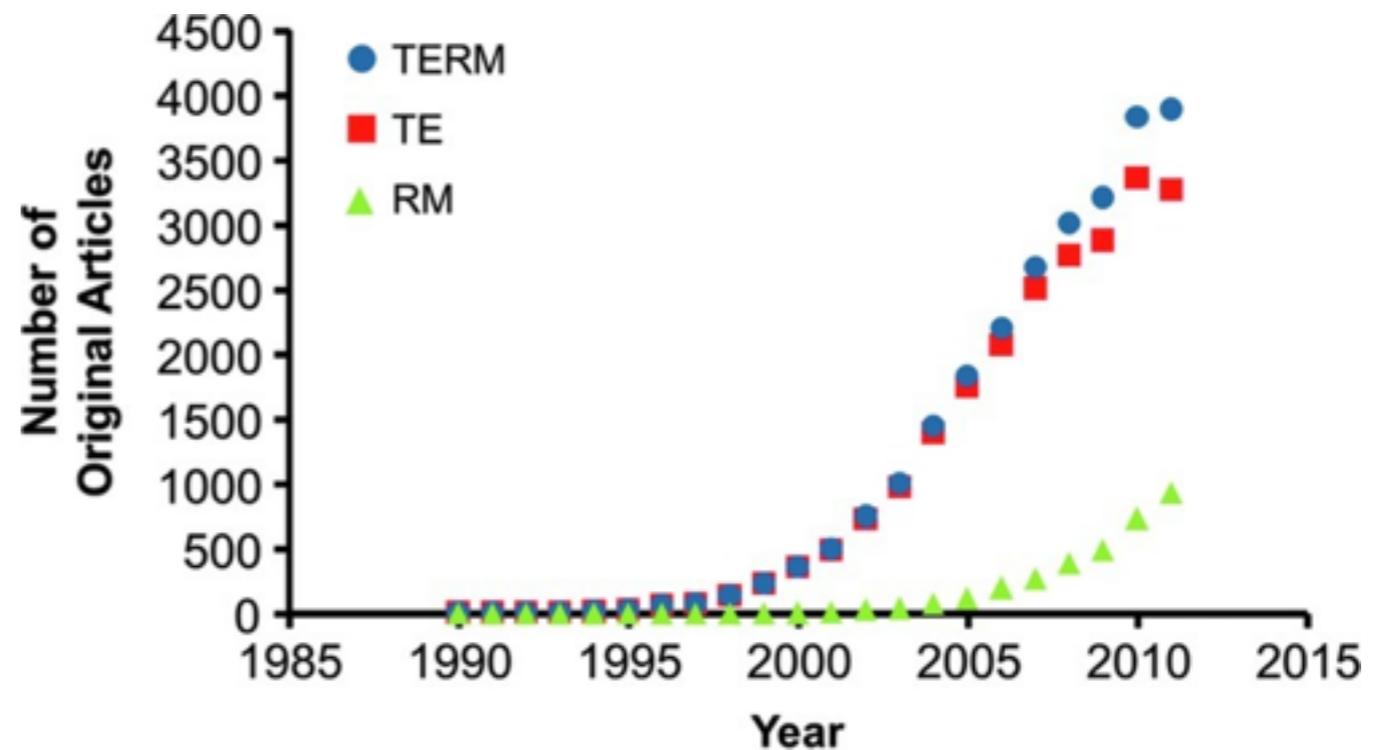
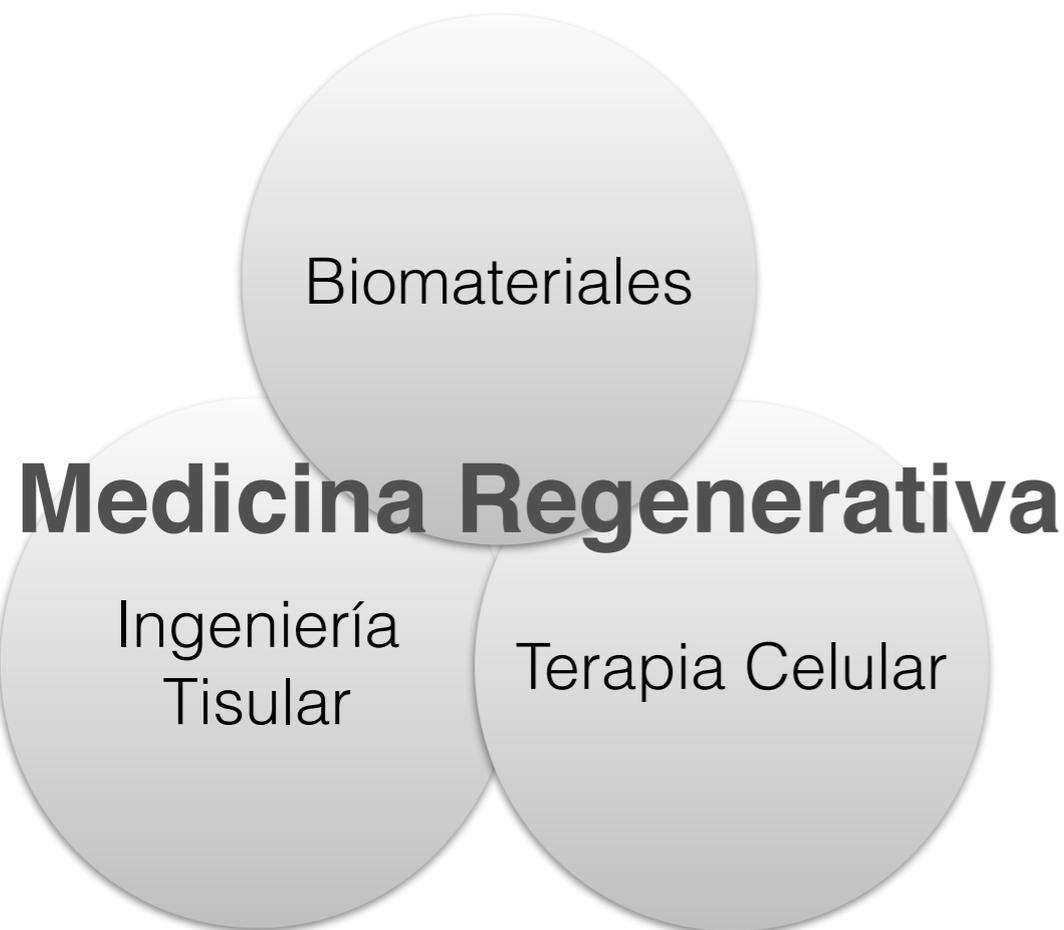
Febrero 2018

Outline

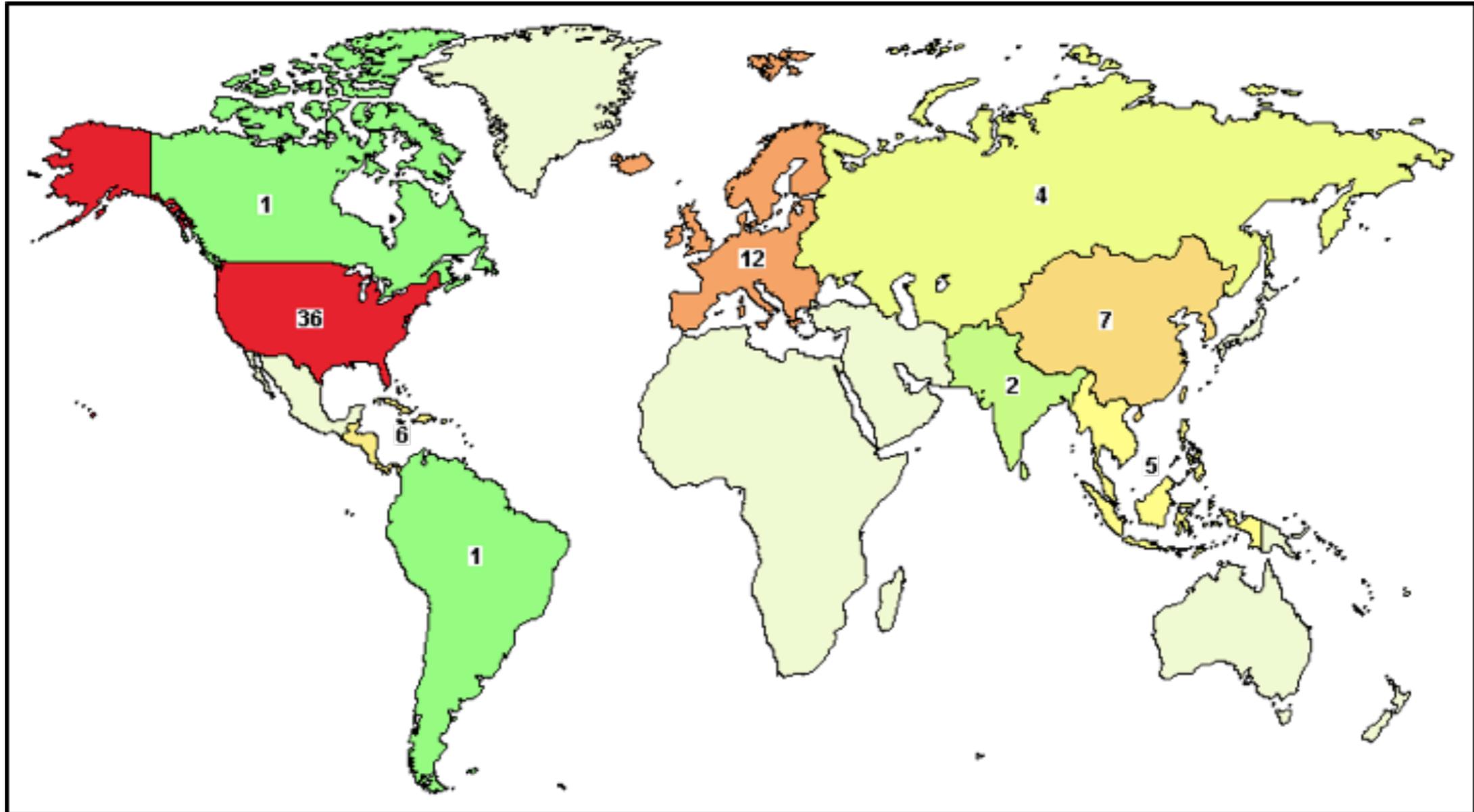
1. Biología del tejido adiposo
2. Aislamiento de SVF
3. Propiedades biológicas de las células SVF
4. Dispositivo GID SVF-2: bases metodológicas
5. Calidad, seguridad y potencia de las células obtenidas mediante el sistema GID.
6. Aplicaciones clínicas con células derivadas de la grasa

Medicina Regenerativa

La Medicina Regenerativa persigue reemplazar células humanas o promover su regeneración para restaurar la función normal de los tejidos u órganos. *Chris Mason*



Estudios clínicos registrados con SVF

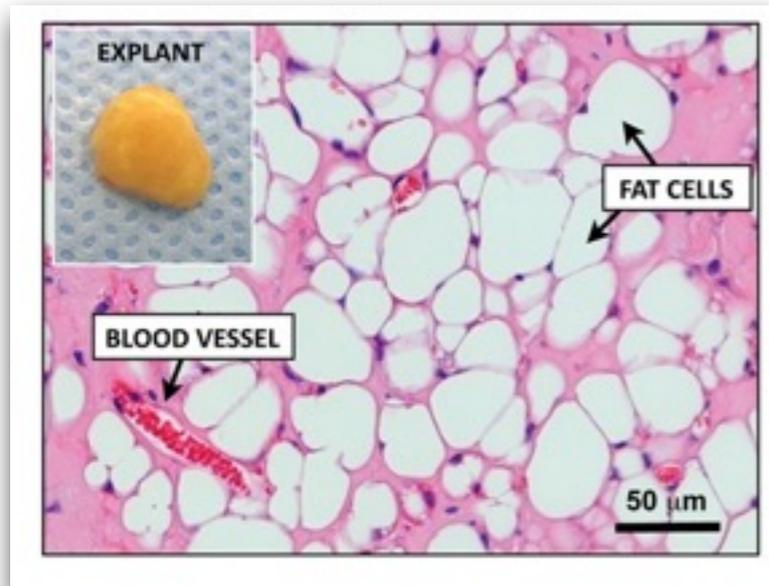


Obtenido en: clinicaltrials.gov

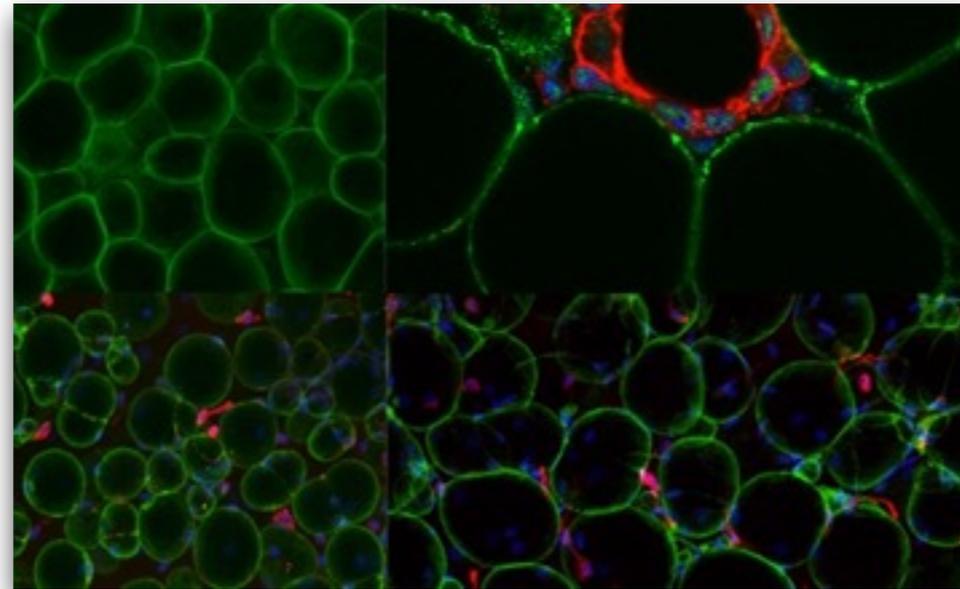
75 estudios registrados en Abril del 2017

42 aparecen activos

Tejido adiposo

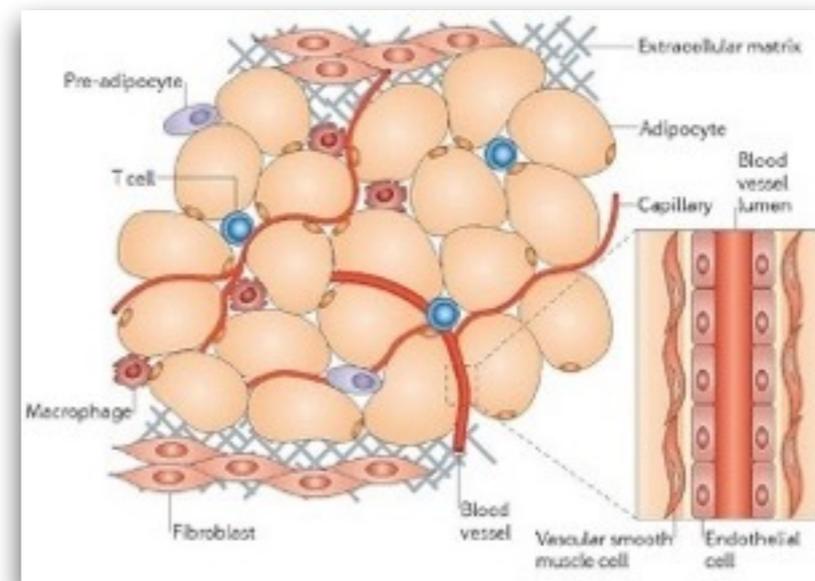


Histología



Microscopía de fluorescencia

Vista esquemática



Funciones del tejido adiposo

- Tejido conectivo laxo: grasa blanca unilocular
- Órgano endocrino: control de metabolismo y otras funciones: leptina, adiponectina, angiotensina, etc
- Soporte y Protección mecánica
- Aislamiento térmico
- Reserva energética
- **Fuente de células**: abundante, accesible y rica en células

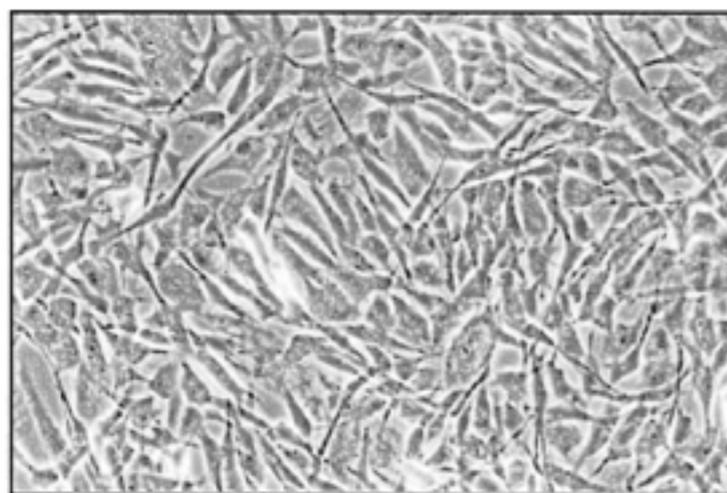
Extracción de Células estromales en grasa

Rodbell, 1964. *J Biol Chem*; Metabolism of isolated fat cells. Effects of hormones on glucose metabolism and lypolysis

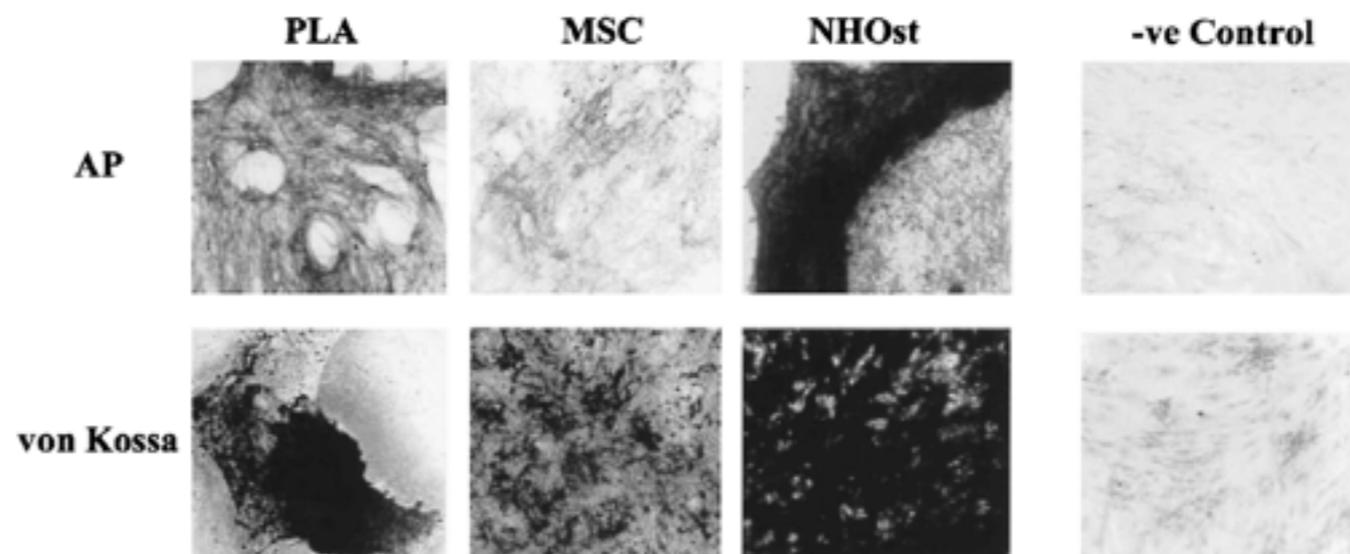
TABLE I
DNA, triglyceride, and protein content of adipose tissue,
free fat cells, and stromal-vascular cells

	DNA*	Protein†	Triglycerides
	μg	mg	nmols/mg DNA
Untreated tissue, 1.9 g.....	346	24	4
Collagenase-treated tissue, 1.9 g			
Free fat cells.....	92	8.5	11
Stromal-vascular cells.....	140	7.5	<0.001
Total.....	232	16	

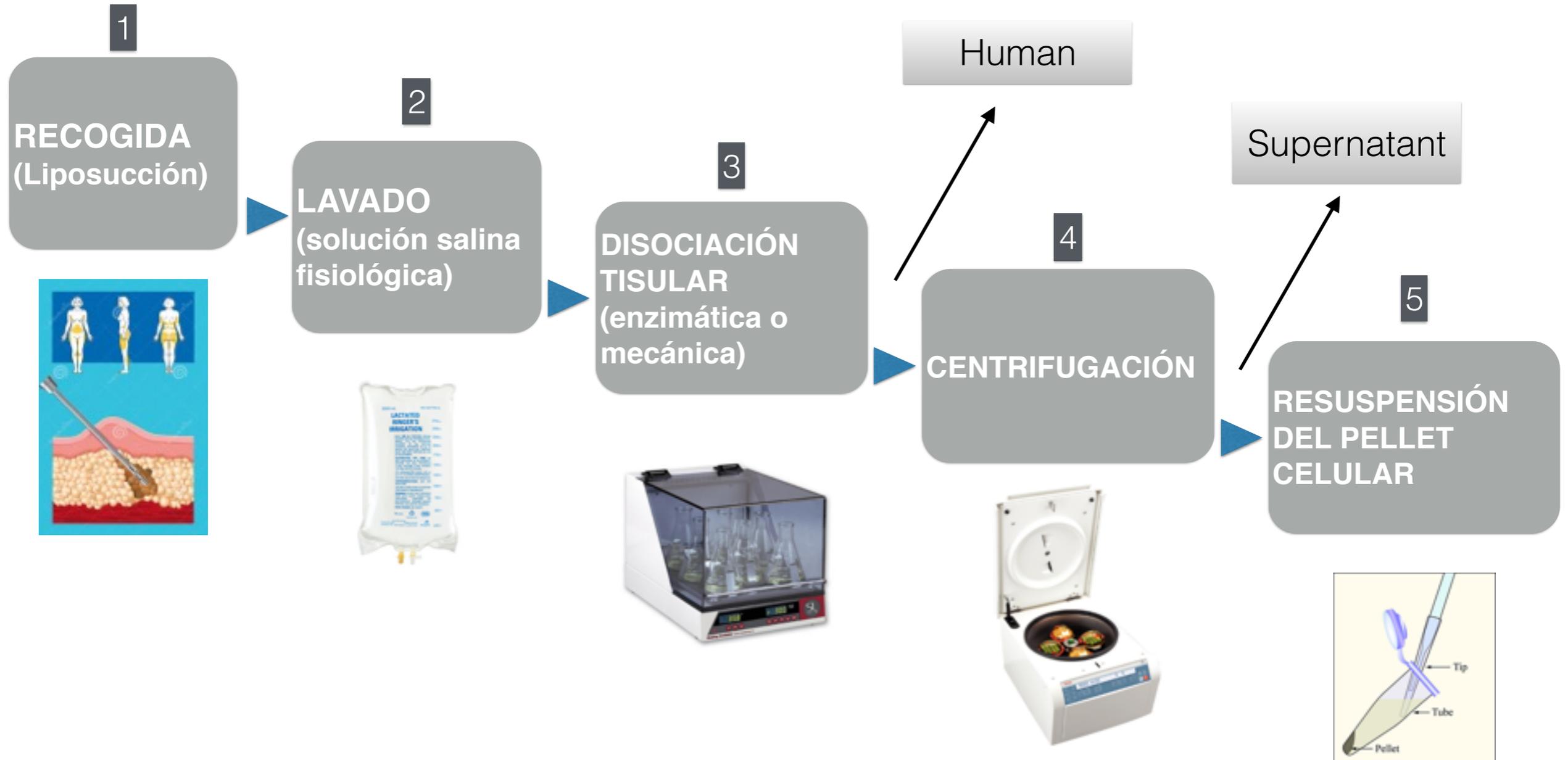
Zuk et al., 2001 *Tissue Engineering*; Multilineage Cells from human adipose tissue: implications for cell based therapies



PLA cells

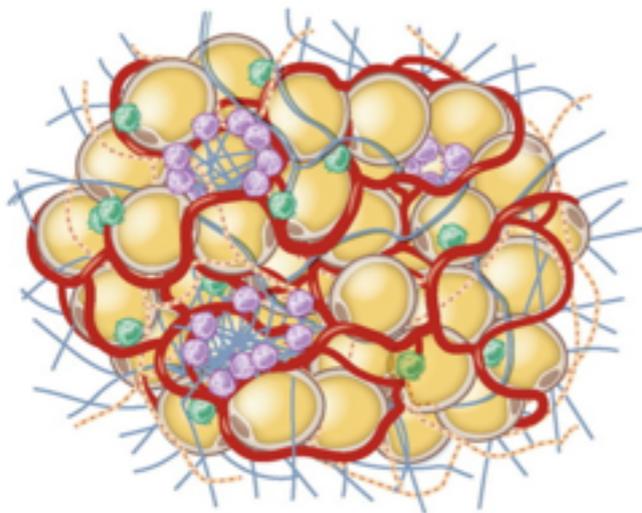


AISLAMIENTO DE LA FRACCIÓN ESTROMAL VASCULAR (SVF)

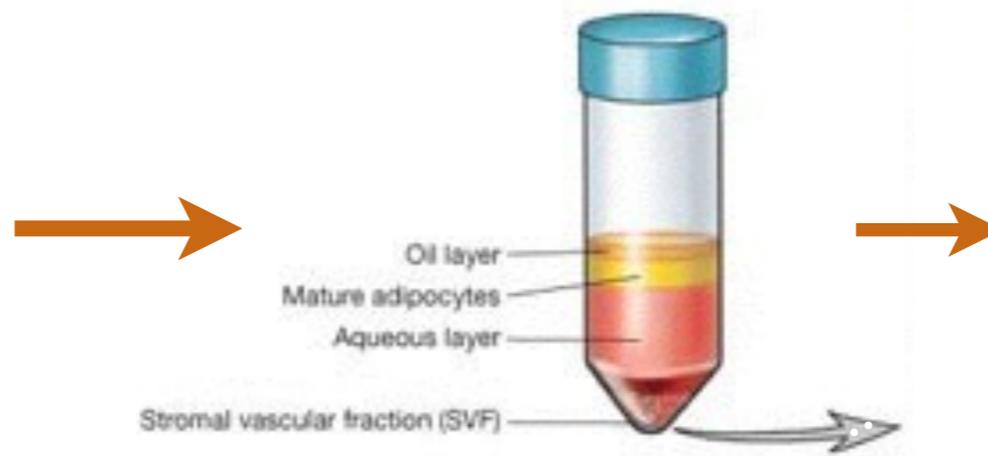


Qué es la SVF/FVE ?

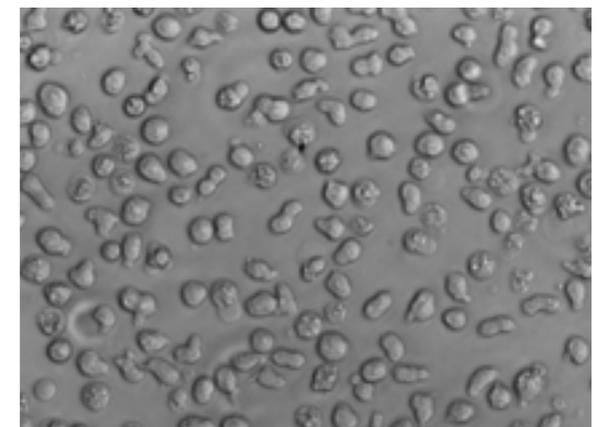
- **Fracción estromal vascular (SVF):** Población heterogénea de distintos tipos celulares obtenidos mediante disociación del tejido adiposo y centrifugación.
- No contiene adipocitos.
- Células aisladas del componente estromal del tejido.



Tejido Adiposo

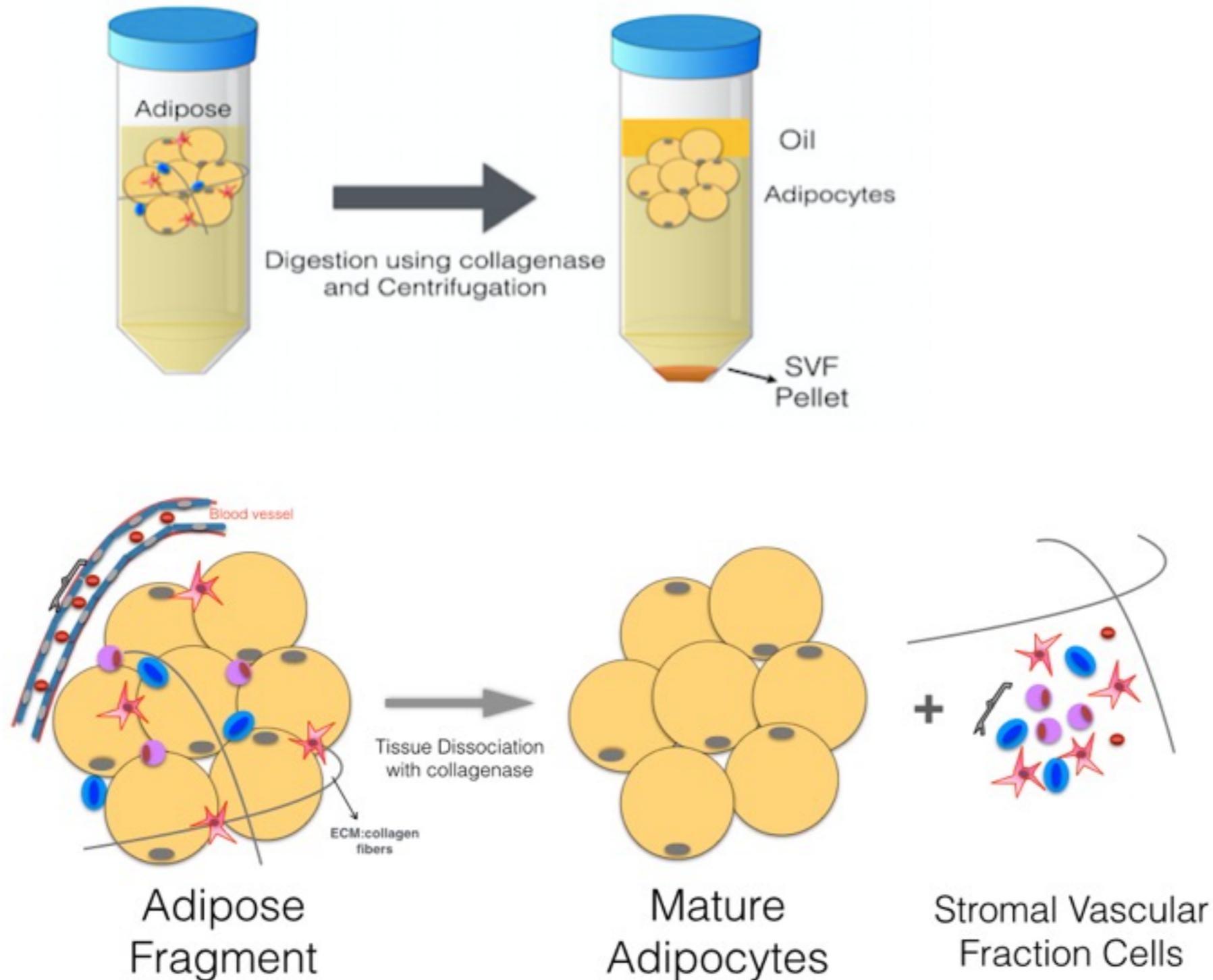


Tejido disociado



Suspensión Celular: SVF

Aislamiento SVF/FVE



Fracción Estromal Vascular: Propiedades biológicas

1. Producción de factores tróficos
2. Capacidad de diferenciación
3. Inmunomodulación
4. Angiogénesis

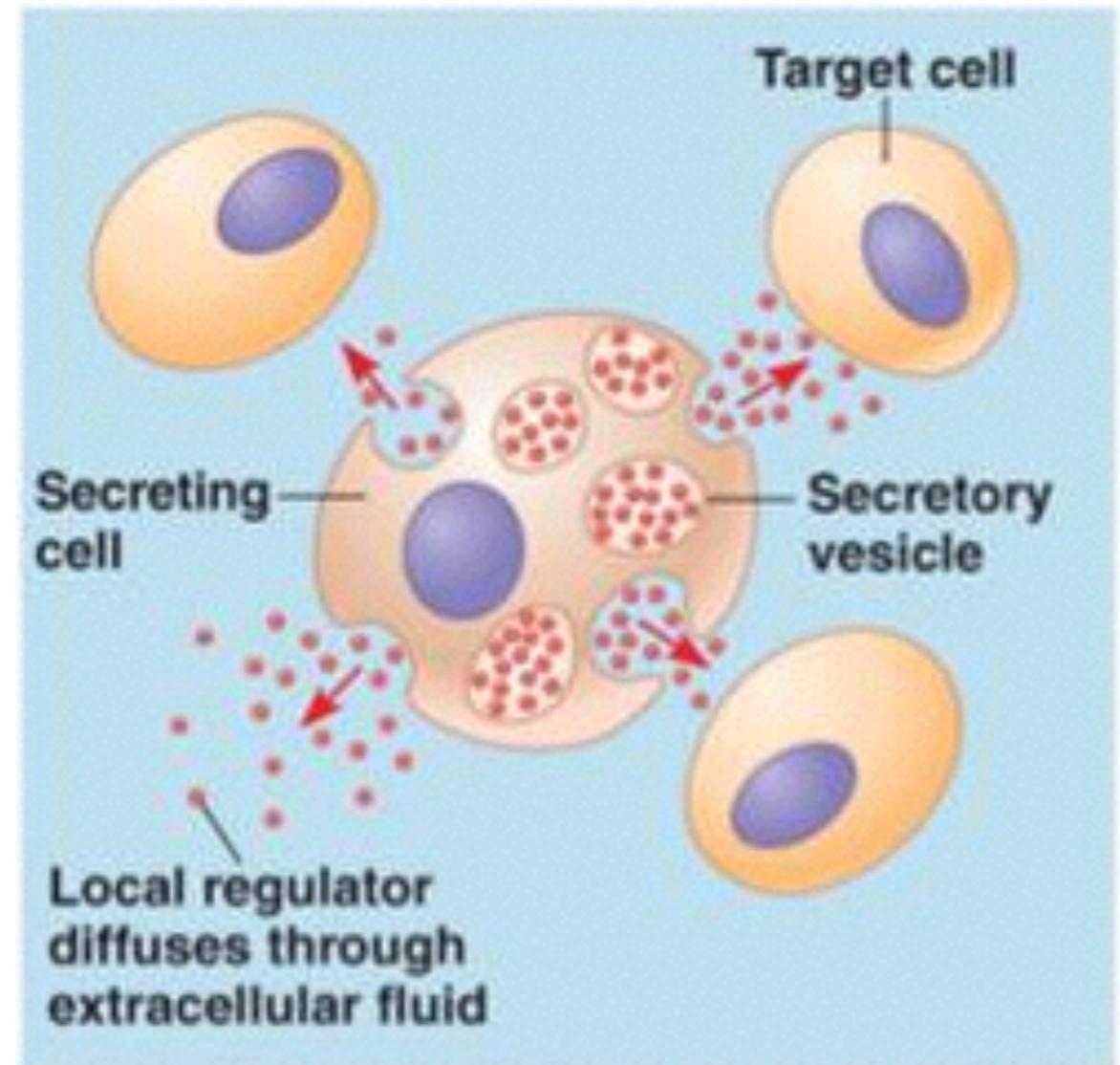
Tipo Celular

Función Biológica

Células madre mesenquimales	Células endoteliales	Fibroblastos	Pericitos	Otras células
Diferenciación celular	Formación vasos sanguíneos	Producción colágeno	Estabilización nuevos vasos	Diversas funciones

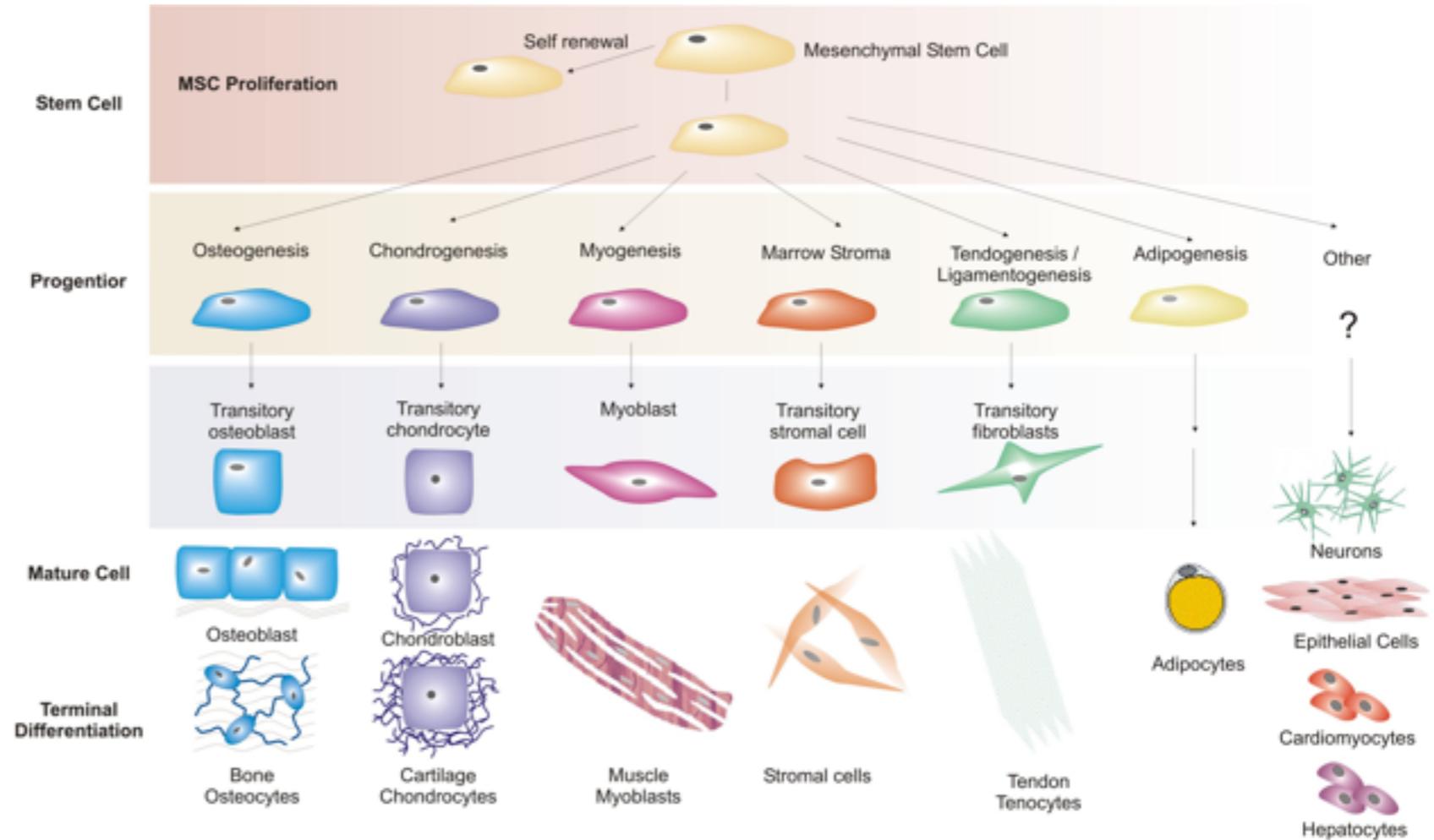
Células SVF: Producción de factores tróficos

- Secreción de factores solubles: anti-apoptóticos (HGF), IGF-1, factores de crecimiento
- Estimulación de la regeneración tisular
- Señalización paracrina



Células SVF : Capacidad de Diferenciación

- Capacidad de diferenciación: MSCs
- Linaje mesodérmico: adipogénico, condrogénico u osteogénico
- Transdiferenciación en condiciones muy específicas



MSC Multilineage Differentiation Potential

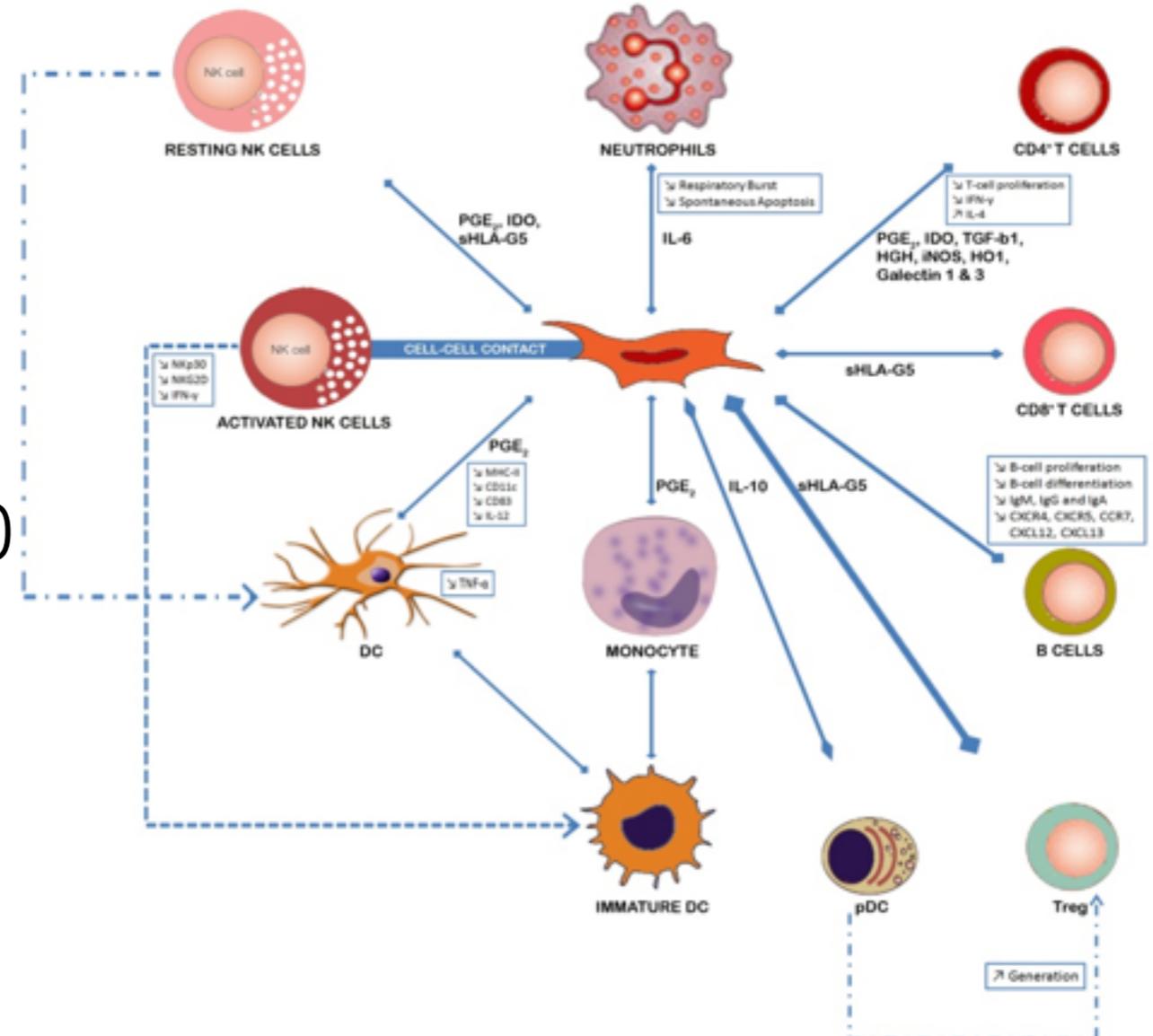
MSCs are able to undergo extensive self proliferation prior to differentiation into a range of mesenchymal tissue and cell types, including bone, cartilage, muscle, stroma, tendon and adipose and evidence has also suggested they have greater plasticity in an ability to differentiate into non-mesenchymal tissues including liver, heart, skin and nervous tissues

Adapted from Caplan and Bruder, 2001. Copyright BTR©

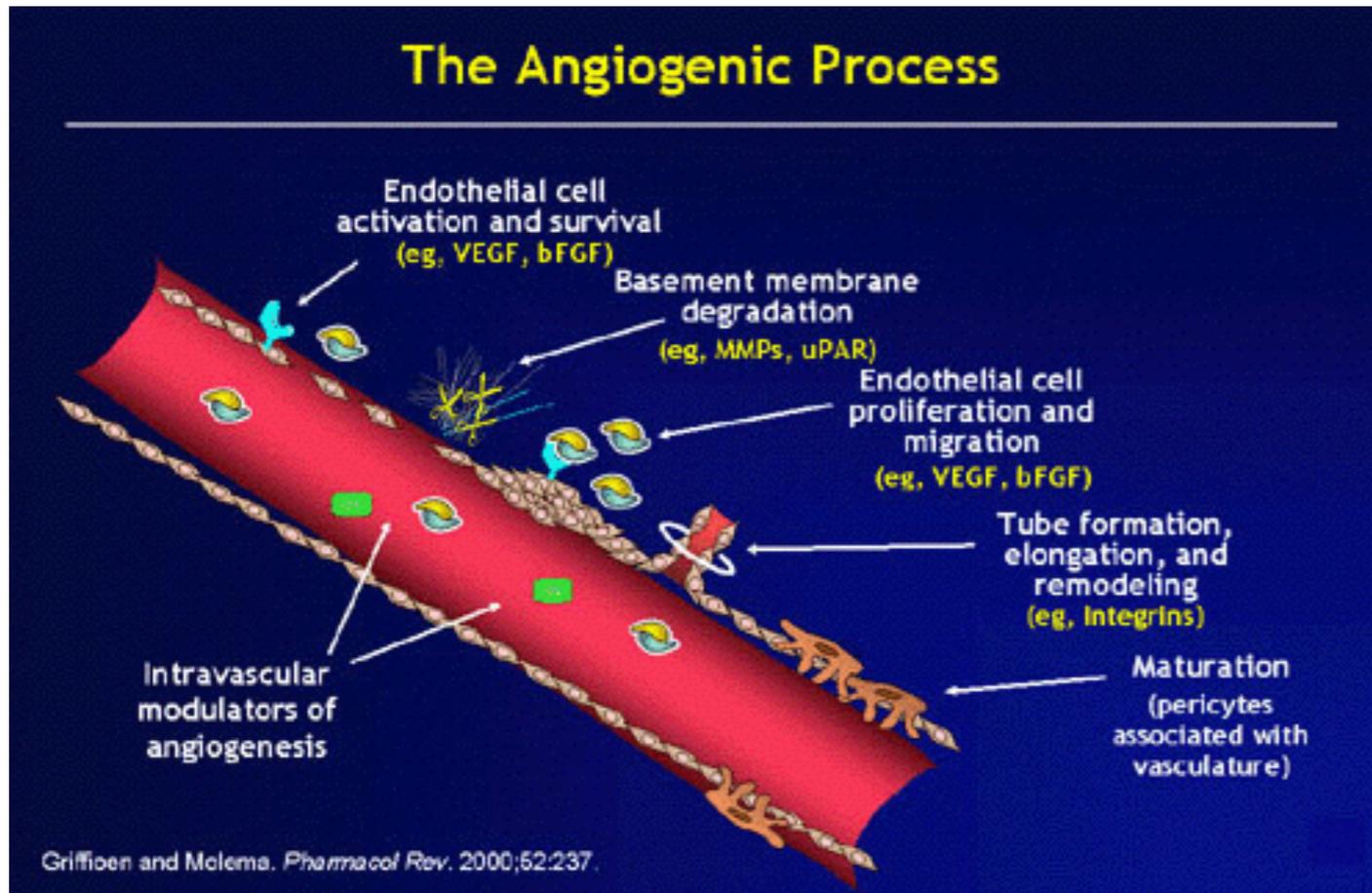
Células SVF: Inmunomodulación

Efectos inmunoreguladores:

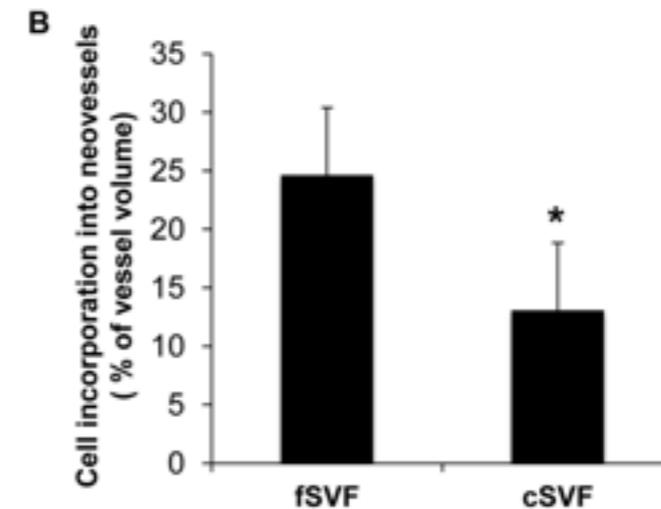
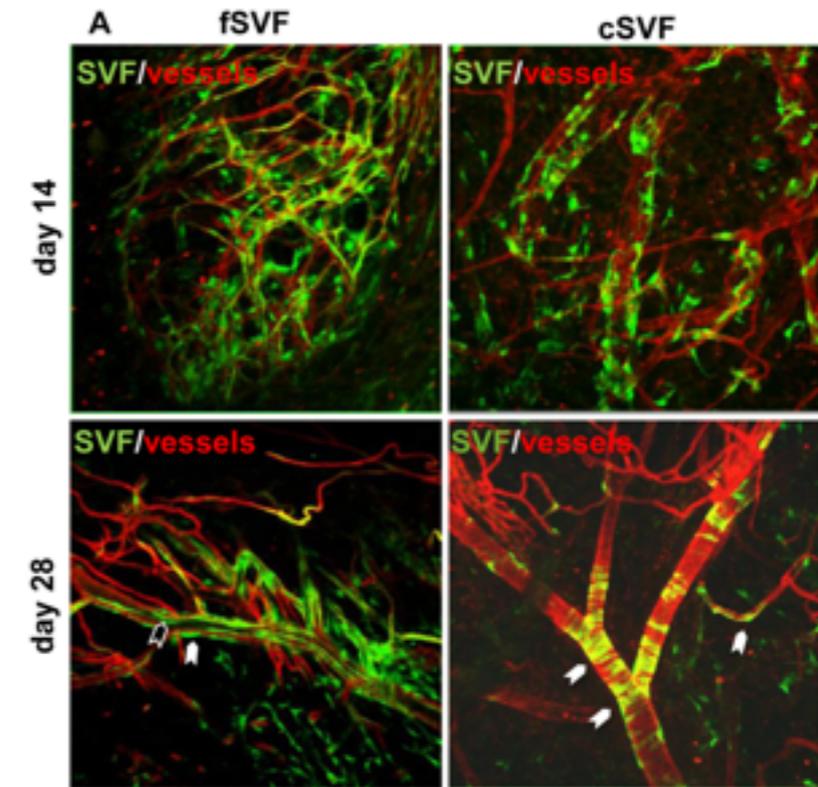
- Descenso de proliferación en linfocitos T
- Liberación de PGE-2
- Inmunosupresión por IL-10
- MSCs se “activan” en un ambiente inflamatorio



Células SVF: Angiogénesis

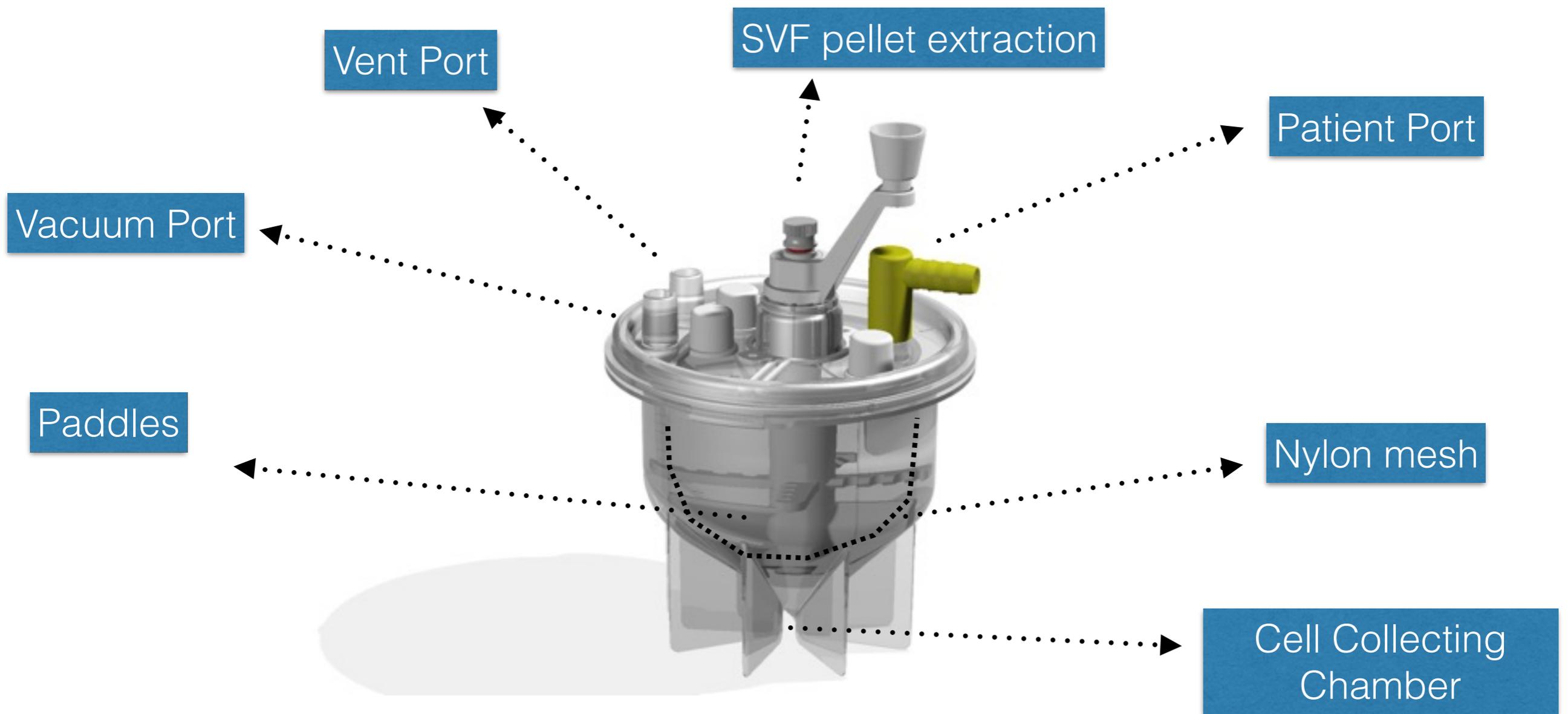


- Estimulación de angiogénesis
- Secreción de factores angiogénicos: FGF, VEGF, Ang1
- Estabilización vascular: pericitos



Nunes et al., 2013, Scientific Reports

Dispositivo SVF-2



Dispositivo médico estéril de un sólo uso con marcado CE
Sistema cerrado: de la recogida a la extracción celular en 60 minutos
Rendimiento: 500.000-1.000.0000 células SVF/gramo grasa
Fácil Manejo



Dispositivo SVF-2

LABORATORY EQUIPMENT



BALANCE



CELL COUNTER



WARMER-SHAKER



CENTRIFUGE



Cart in OR containing all equipment

GIDzyme-2-50



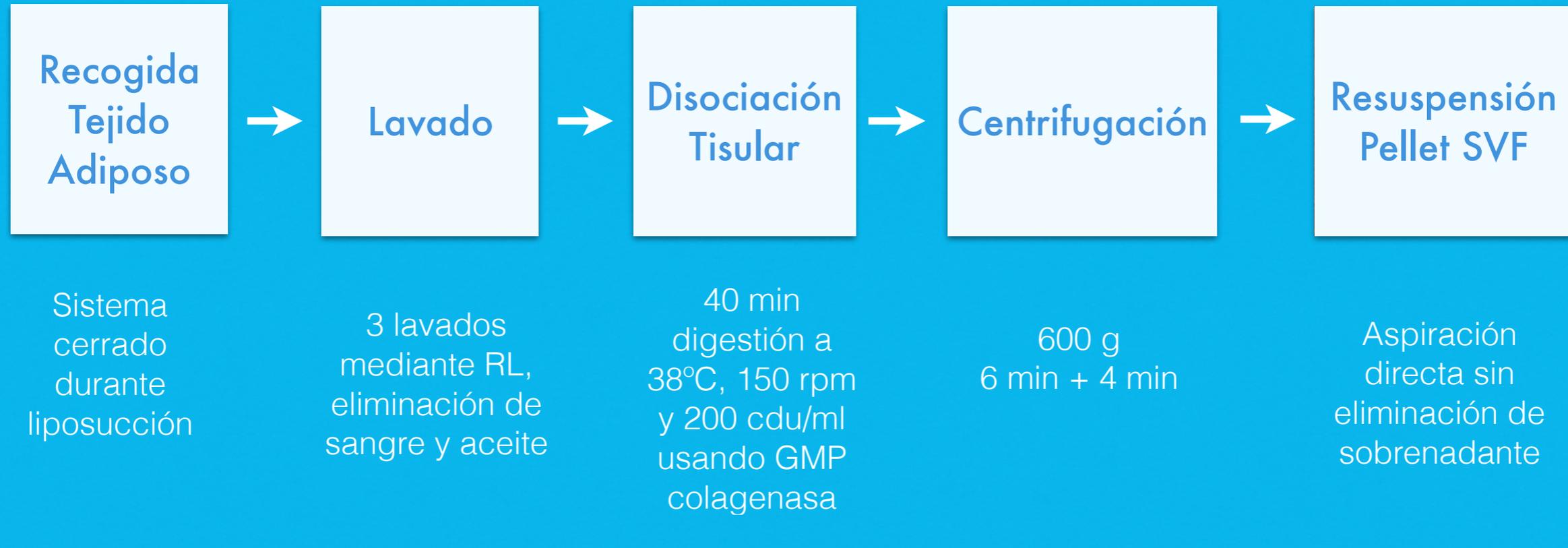
GID SVF Procedure Pack

- Utiliza equipamiento de laboratorio disponible comercialmente
- GMP colagenasa
- Descartables disponibles
- Puede utilizarse en quirófano o laboratorio

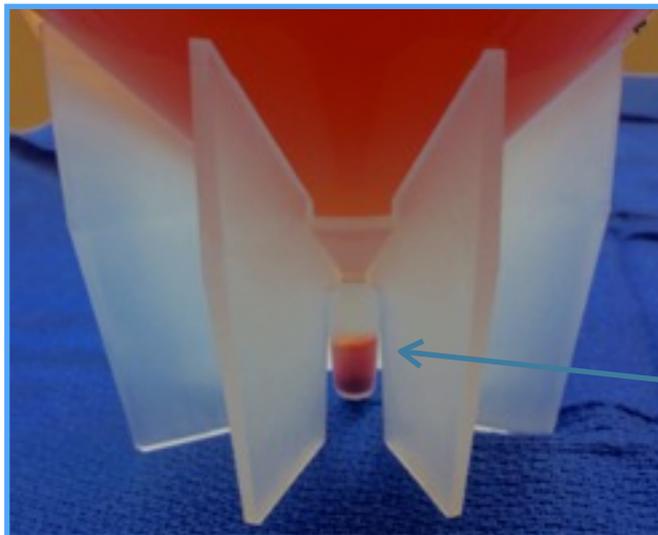


Aislamiento de células mediante dispositivo SVF-2

Aislamiento SVF mediante SVF-2



60 minutos



SVF pellet
(listo para resuspensión)

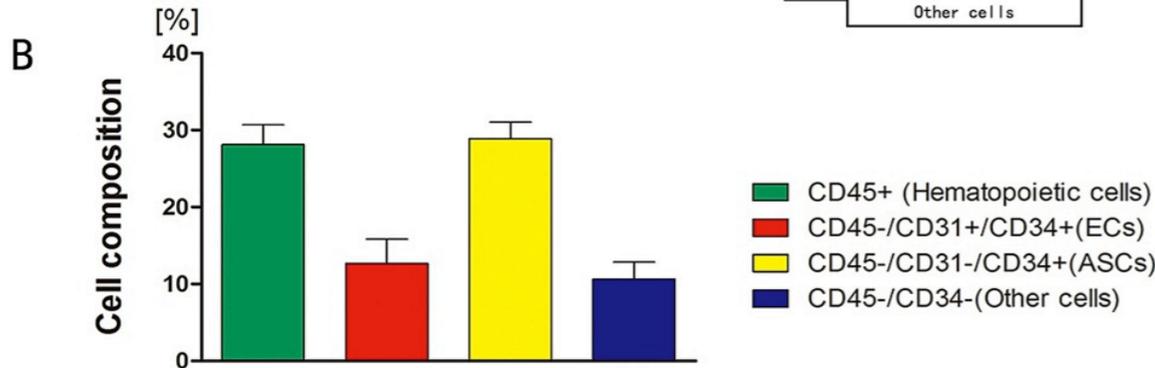
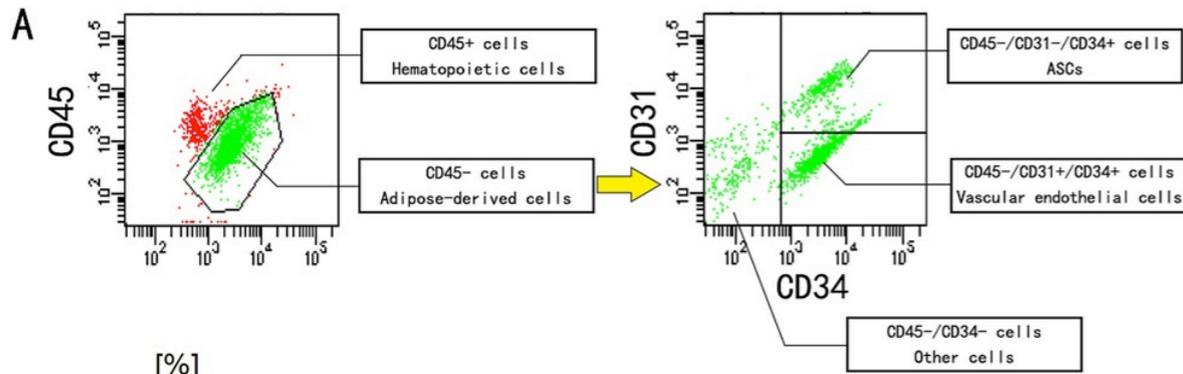
SVF-2 Device Performance

Características técnicas SVF-2

Volumen de procesamiento (Grasa seca)	20 - 130 cc
Tiempo Aislamiento SVF	60 minutos
Rendimiento (Células nucleadas por gramo de tejido adiposo)	0,5 - 1 millones
Niveles de endotoxina (EU/ml)	menos de 4 EU/ml
Esterilidad (Tinción Gram y cultivo microbiológico)	Negativo
Actividad Colagenasa Residual	≤ 10 CDU/ml

Seguridad y Calidad del Producto Celular

SVF: Caracterización por citometría



ALTO % DE CÉLULAS ESTROMALES PROGENITORAS
(CD34 +)
BAJA CANTIDAD DE CÉLULAS DE LA SANGRE (CD45+)
MENOS ERITROCITOS

Fracción Estromal Vascular

Células derivadas de grasa

CD45-
80 %

Adipose Stromal/Stem Cells
13,1 %

Mature endothelial cells
5-10 %

Pericytes and fibroblasts
around 10 %

Endothelial progenitors
7,3 %

Células Hematopoyéticas:

linfocitos, neutrófilos, macrófagos

CD45+
20%

Uso de fracción estromal vascular en traumatología

Severiano Dos Anjos
PhD Cellular Biologist

Posibles Aplicaciones Clínicas

1. Osteoartritis: rodilla y cadera, articulaciones
2. Osteonecrosis de la cabeza del fémur
3. Fracturas óseas complejas
4. Tendinopatías
5. Pseudoartrosis

Células SVF y formación de hueso

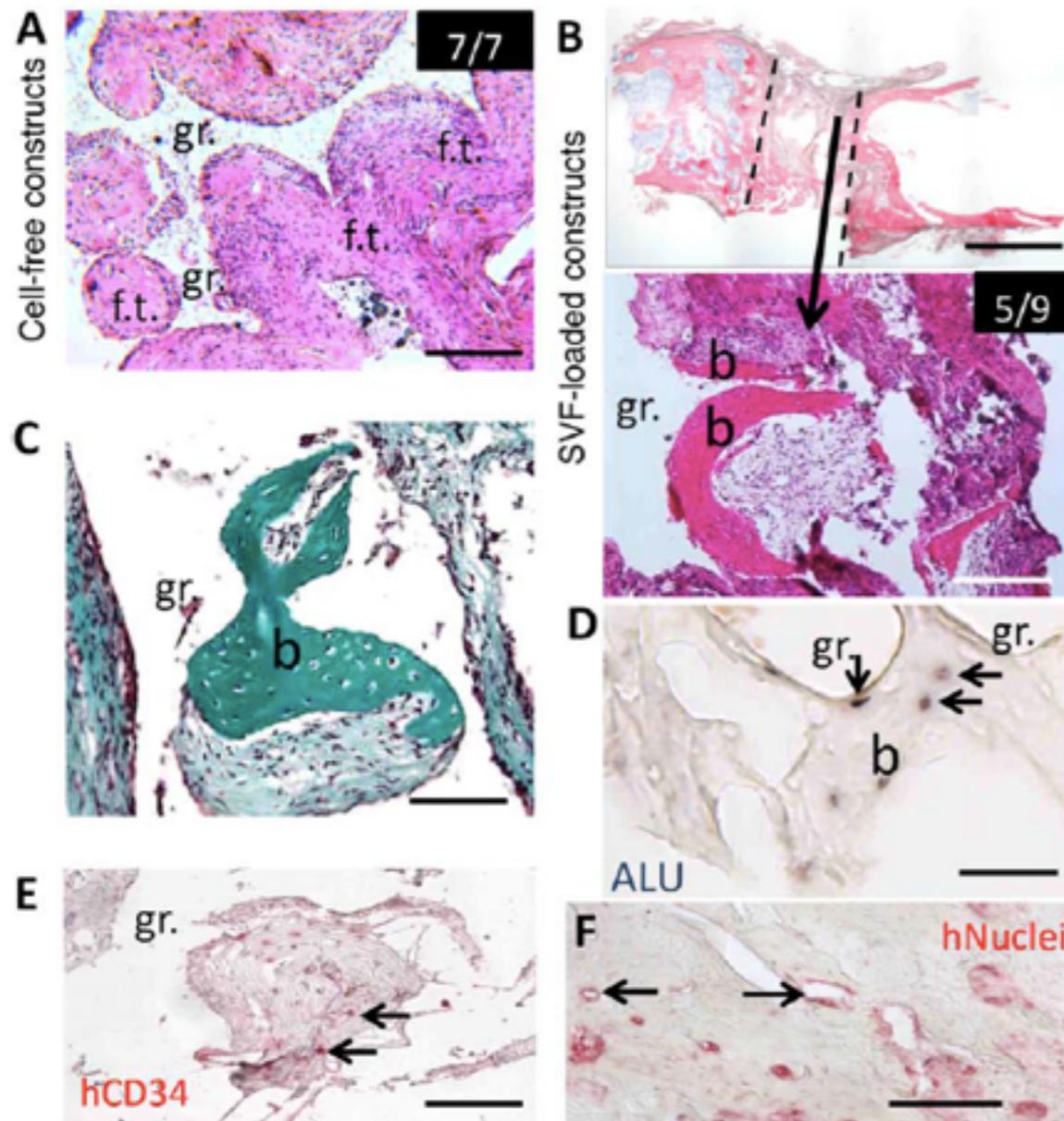
Uso de células SVF en fracturas óseas:
modelos preclínicos y uso en humanos

- Todorov et al., 2016. *Stem Cells Translational Medicine*. Fat Derived Stromal Vascular Fraction Cells Enhance the Bone-Forming Capacity of Devitalized Engineered Hypertrophic Cartilage Matrix.
- Saxer et al., 2016. *Stem Cells*. Implantation of Stromal Vascular Fraction Progenitors at Bone Fracture Sites: From a Rat Model to a First-in-Human Study.

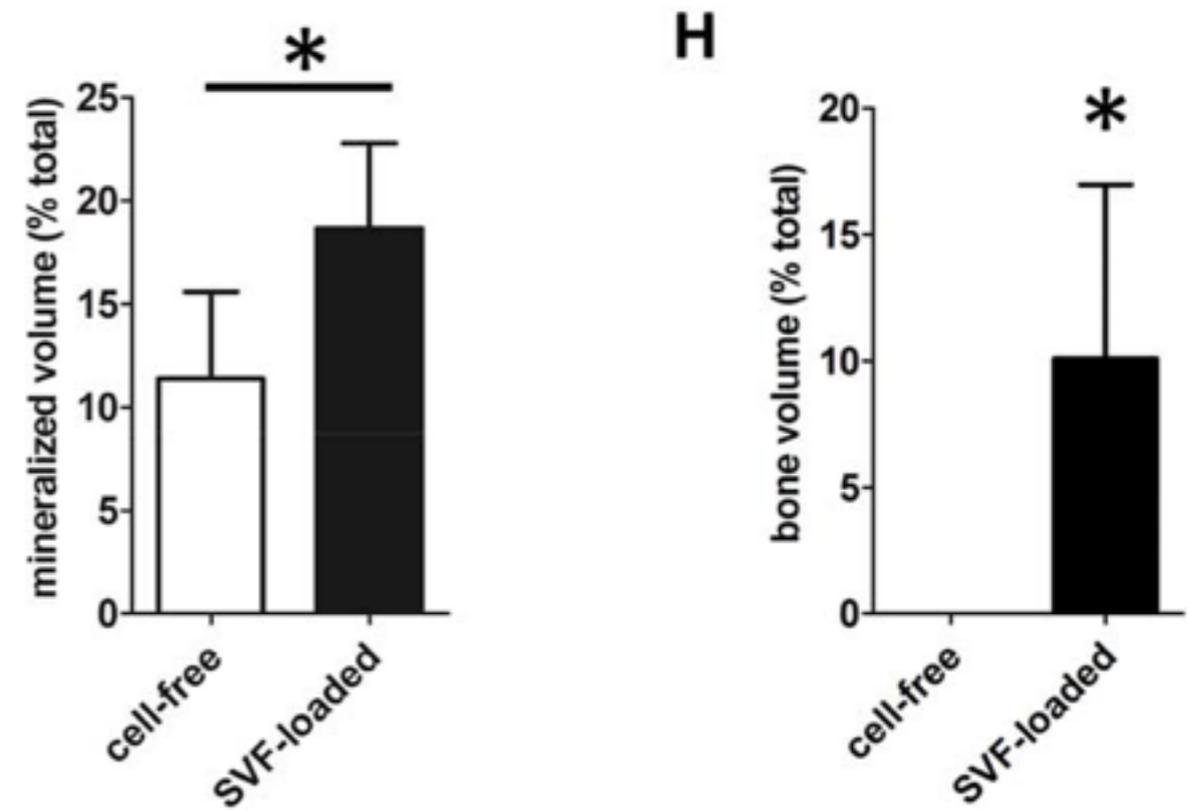
SVF: USO EN TRAUMATOLOGÍA

Saxer et al., 2016; Stem Cells

Las células SVF son capaces en fresco (sin necesidad de cultivar) de formar tejido óseo con vasos sanguíneos en el microambiente de una fractura

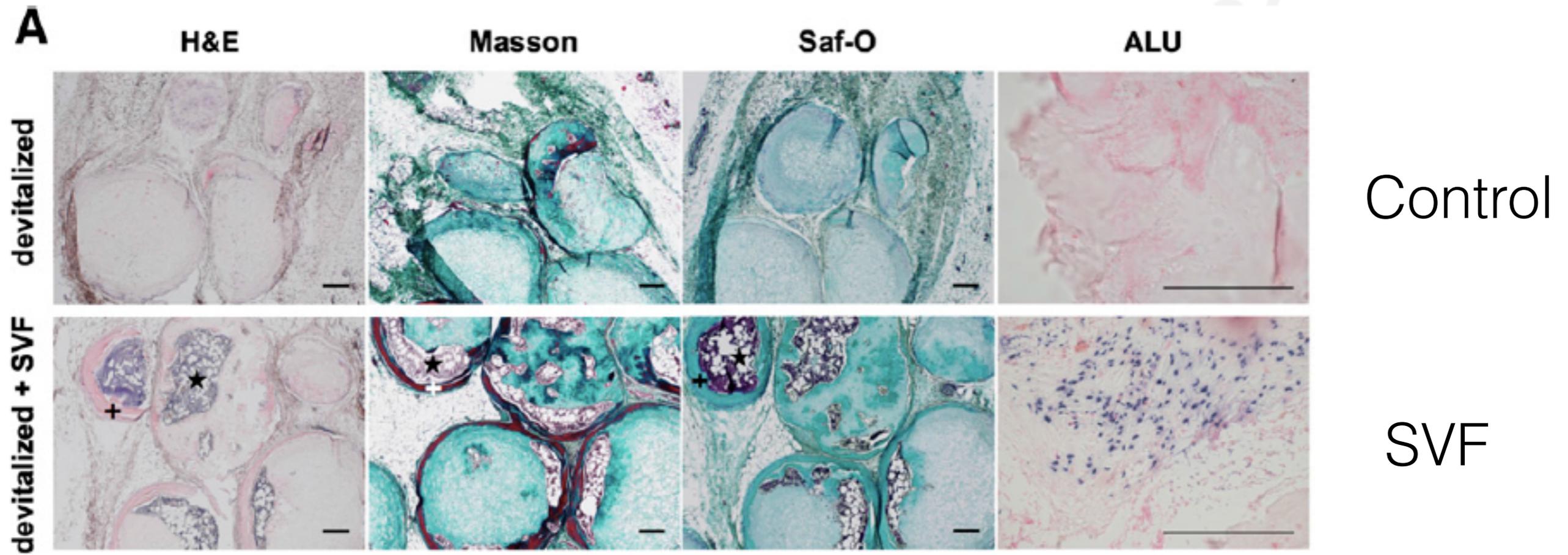


VOLUMEN DE HUESO MINERALIZADO

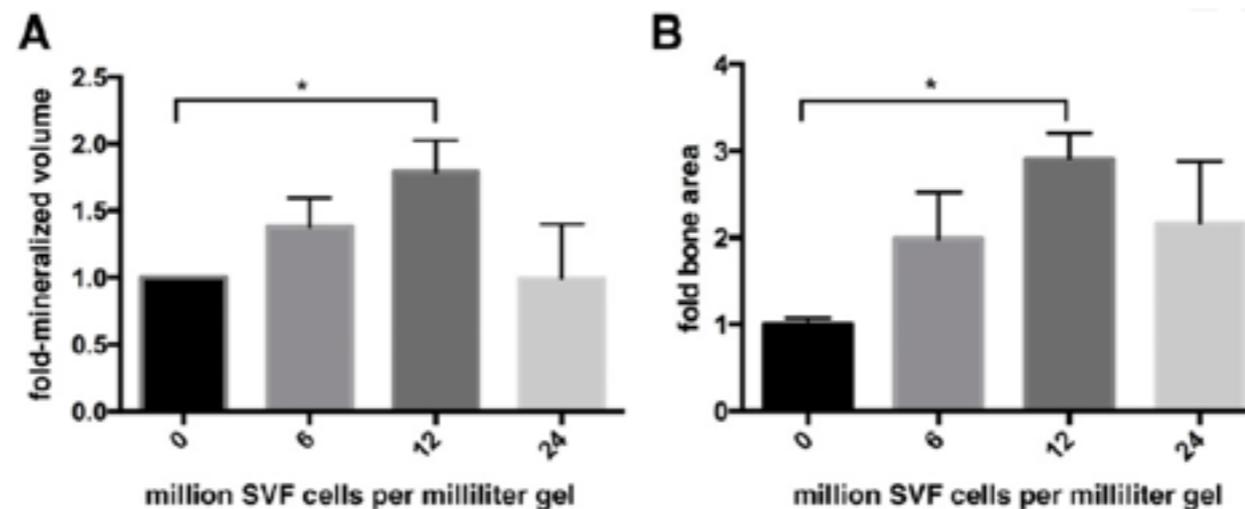


SVF: USO EN TRAUMATOLOGÍA

Todorov et al., 2016, Stem Cells Translational Medicine



Mineralización ósea



Existe correlación entre la formación de matriz mineralizada y el número de células endoteliales presentes en la SVF

Mejor Fuente de Células Tejido Adiposo vs Médula Osea

Table 1

MSC and CFU-F concentrations and frequency derived from adult and near-fetal tissues

<i>Human tissue source</i>	<i>Native CFU-F concentration range per ml of fluid/tissue</i>	<i>MSC frequency range (CFU-F/10⁶ nucleated cells)</i>	<i>References</i>
Bone marrow aspirate	109–664 ^a	10–83	91 , 183 , 184 , 185 , 186 , 187
Adipose/lipoaspirate	2058–9650	205–51 000	98 , 184 , 188 , 189 , 190
Dermis	Not reported	74 000–157 000	89
Umbilical cord blood	0.06	0–0.02	184 , 185 , 191 , 192
Peripheral blood	0	0–2 ^b	185 , 192 , 193
Synovial fluid	4–14	2–250	92 , 194
Amniotic fluid	3	9.2	195

^aBased on average of 8×10^6 nucleated cells per ml bone marrow aspirate. [183](#)

^bOccurance of CFU-F in peripheral blood requires systemic treatment with GCSF.

Murphy and Caplan, 2013 Exp Mol Med

Células de Grasa vs Células Médula Ósea

Clin Orthop Relat Res
DOI 10.1007/s11999-015-4385-8

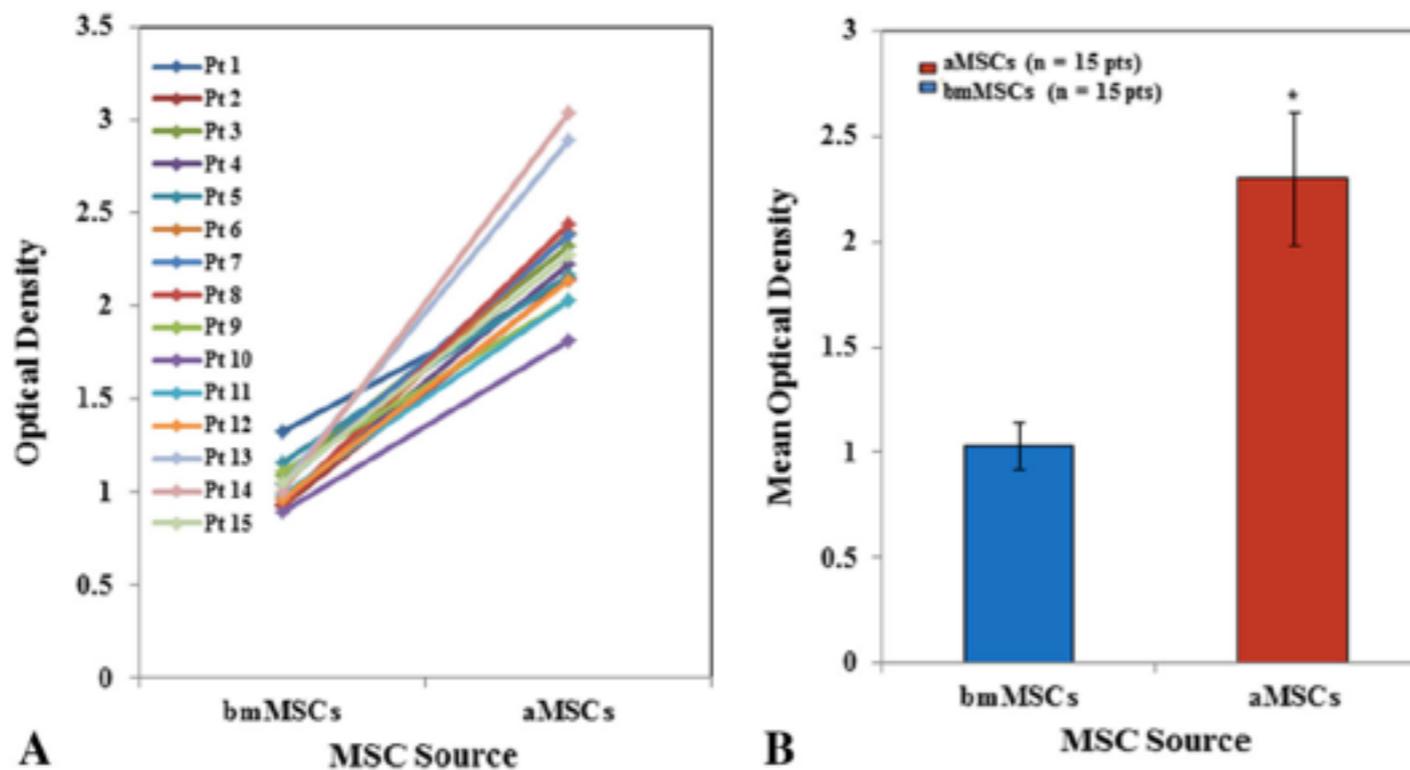
Clinical Orthopaedics
and Related Research®
A Publication of The Association of Bone and Joint Surgeons®



BASIC RESEARCH

Adipose-derived Mesenchymal Stem Cells Are Phenotypically Superior for Regeneration in the Setting of Osteonecrosis of the Femoral Head

Cody C. Wyles BS, Matthew T. Houdek MD, Ruben J. Crespo-Diaz PhD, German A. Norambuena MD, Paul G. Stalboerger MS, Andre Terzic MD, PhD, Atta Behfar MD, PhD, Rafael J. Sierra MD



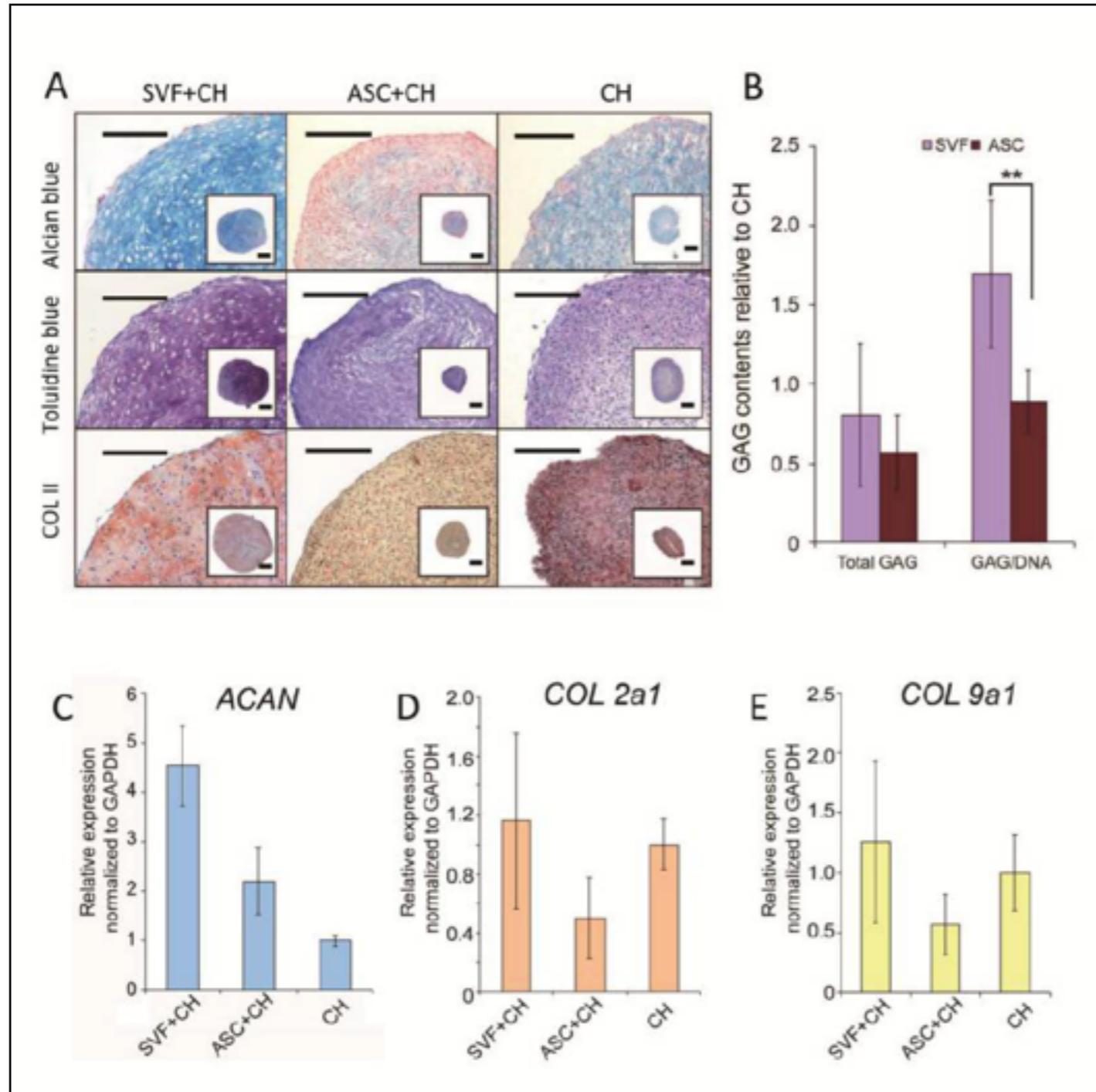
DIFERENCIACIÓN OSTEOGÉNICA
FOSFATASA ALCALINA

Fig. 4A–B aMSCs show increased osteogenic differentiation potential compared with bmMSCs. After the third passage, cells in culture were grown in osteogenic differentiation media for 14 days. Alkaline phosphatase activity was measured as optical density between aMSCs

and bmMSCs from the same 15 patients (pts). (A) Optical density was increased in aMSCs for all 15 patients. (B) aMSCs showed a 2.5-fold increase in optical density across the entire cohort ($p < 0.001$).

Células frescas vs Células cultivadas

SVF vs ASCs



- La mezcla SVF + condrocitos: más efectiva
- Más glucosaminoglucanos
- Mayor expresión colágeno tipo II, tipo IX y aggrecan
- Superior al uso de ASCs cultivadas

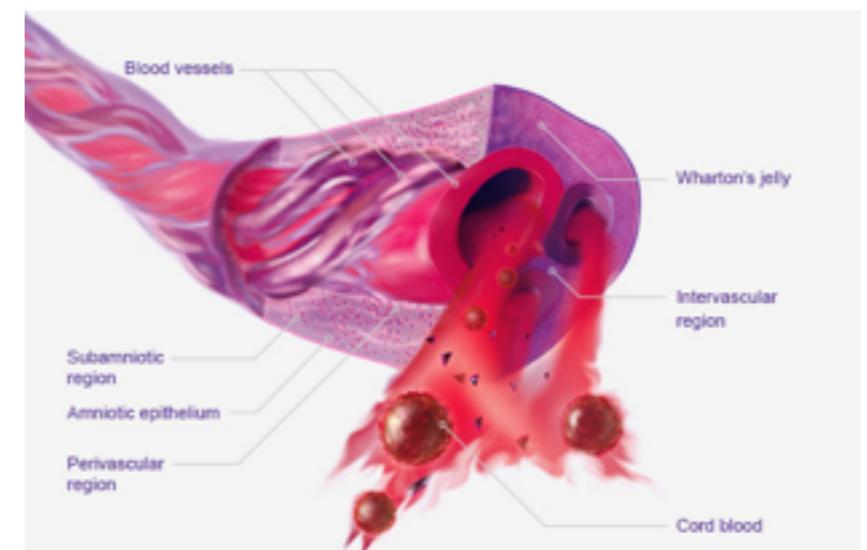
In vitro cell pellet culture

PRP vs Adipose SVF

	PRP	Adipose SVF Cells
Cell Content	Do not contain cells (or only blood derived cells)	Contain a significant amount of MSCs
Treatment efficacy	Weak	Pointing towards a much higher efficacy
Therapy	Indirect: Based on activity of growth factors	Direct: Based on cells intrinsic activity
Clinical Setting	Ambulatory	Surgical Room
Method	Only centrifugation	Tissue Dissociation (enzymatic) and centrifugation

Células de sangre de cordón umbilical

- Sangre de cordón umbilical como fuente de células
- Fácil de obtener
- Se recoge tras el nacimiento y se criopreserva en bancos
- Alto porcentaje de células madre hematopoyéticas
- Células pluripotentes capaces de regenerar completamente el sistema hematopoyético: producción de todas las células sanguíneas.
- Evidencia demostrada principalmente en enfermedades de la sangre: anemias, leucemia, etc
- Pocas evidencias en el resto de aplicaciones
- Posibles problemas de rechazo inmunológico asociados a trasplante alogénico.



Conclusiones generales

1. Uso de SVF es autólogo, inmediato (en fresco) y sin riesgo de rechazo, sin necesidad de cultivo celular.
2. Importancia **Ensayos de calidad**: Contaje celular
3. **Evaluación clínica** pre y post-operatoria de resultados
4. Elección del método correcto con **base científica**: uso de dispositivos médicos,
5. La grasa contiene una gran cantidad de células madre mesenquimales y otros tipos celulares (necesidad estudios clínicos comparativos)
6. Médicos especialistas dirigiendo **equipos multidisciplinares**: biólogos, veterinarios, biotecnólogos, estadísticos
7. Medicina basada en la **evidencia**

Muchas gracias por su atención

sevedos@yahoo.es

Innotech
Medica



GID SVF-2 Device