

Fracción estromal vascular derivada de tejido adiposo: obtención, propiedades biológicas y mecanismos de acción

Severiano Dos Anjos Vilaboa
PhD Biologist



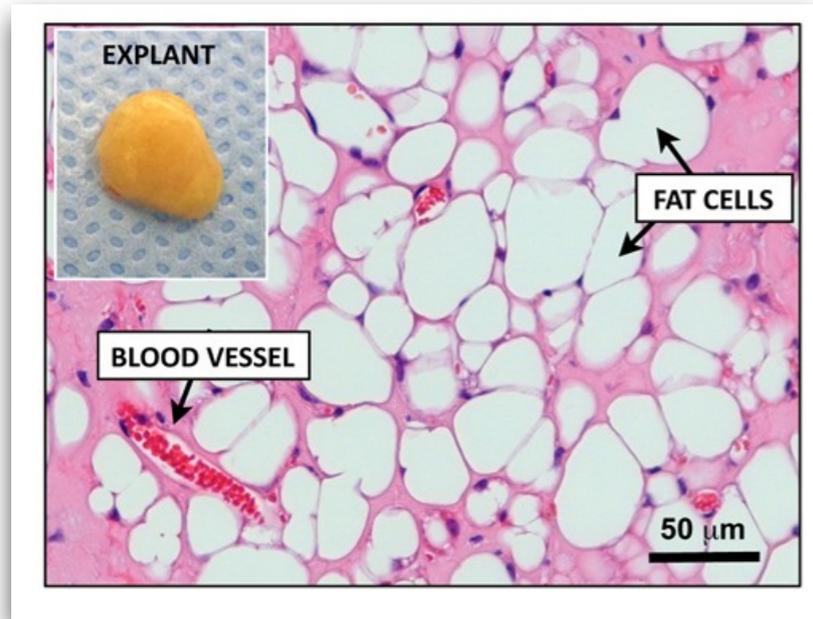
ORTOBIOLOGÍA

Madrid, Mayo 2020

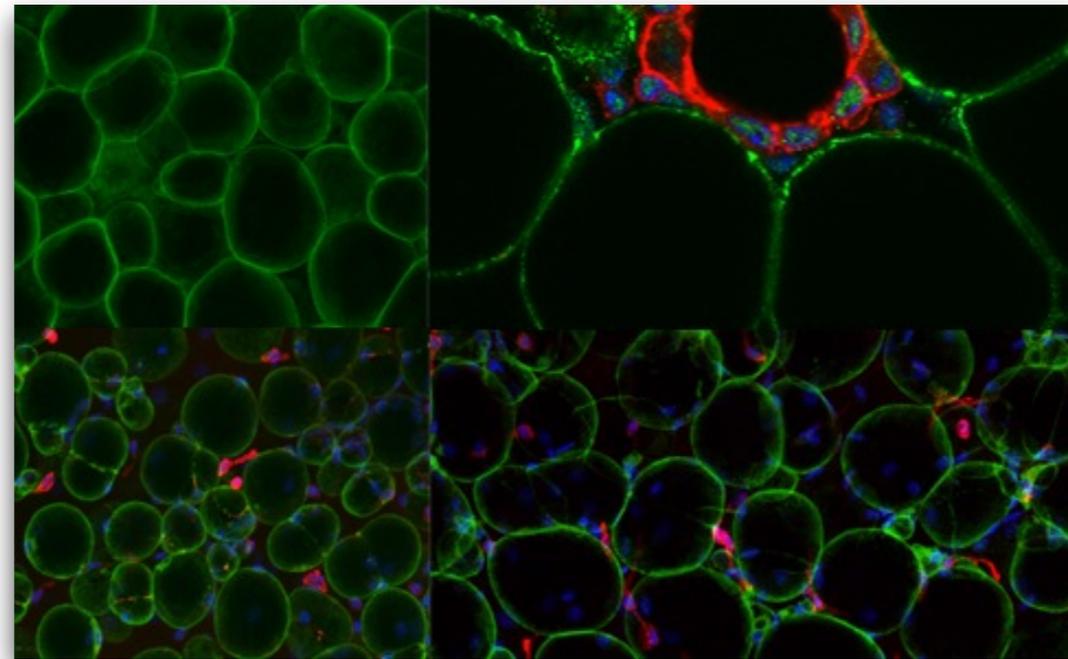
Outline

1. Biología del tejido adiposo
2. Aislamiento de SVF
3. Propiedades biológicas SVF
4. Mecanismos de acción en tejidos musculoesqueléticos
5. Tejido Adiposo vs Médula Ósea
6. Aplicación clínica
7. Futuro

Tejido Adiposo

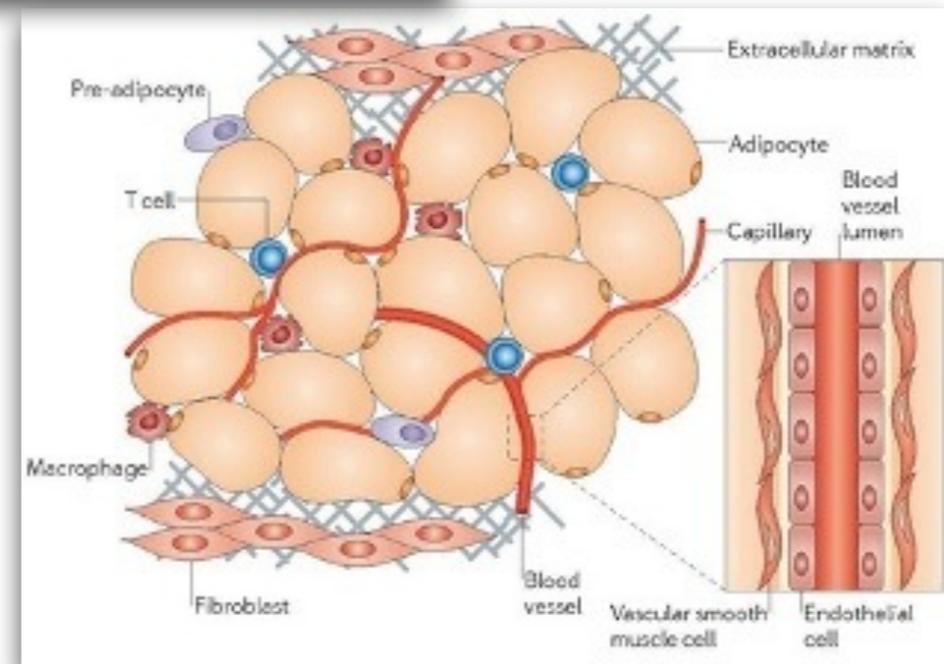


Histología



Microscopía de fluorescencia

Vista esquemática



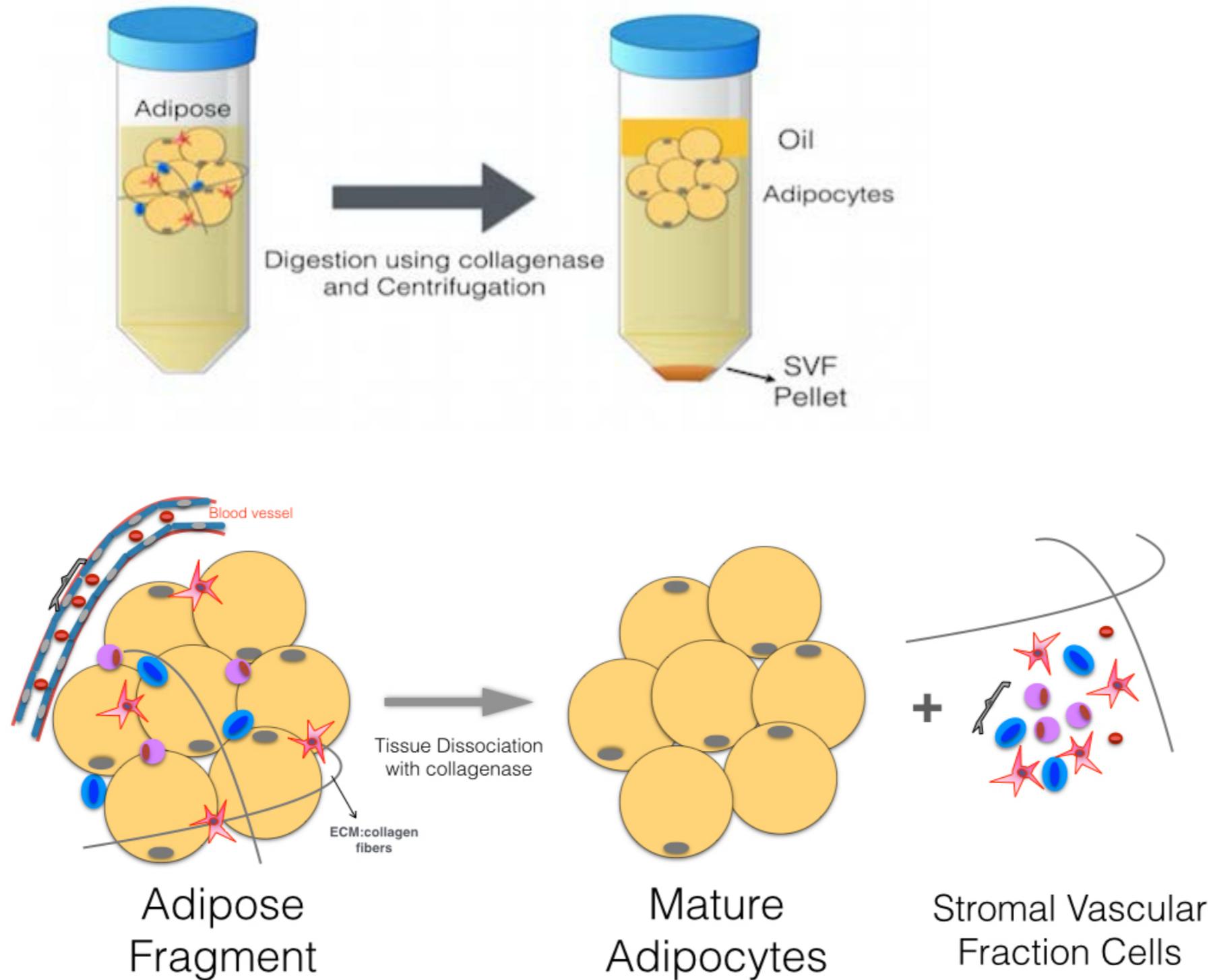
Funciones del Tejido Adiposo

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

Aislamiento de Fracción Estromal Vascular (SVF)

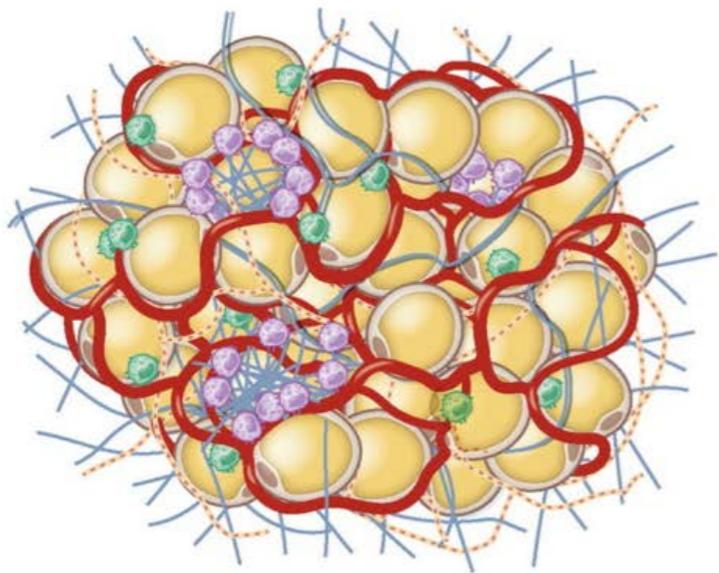


Aislamiento SVF

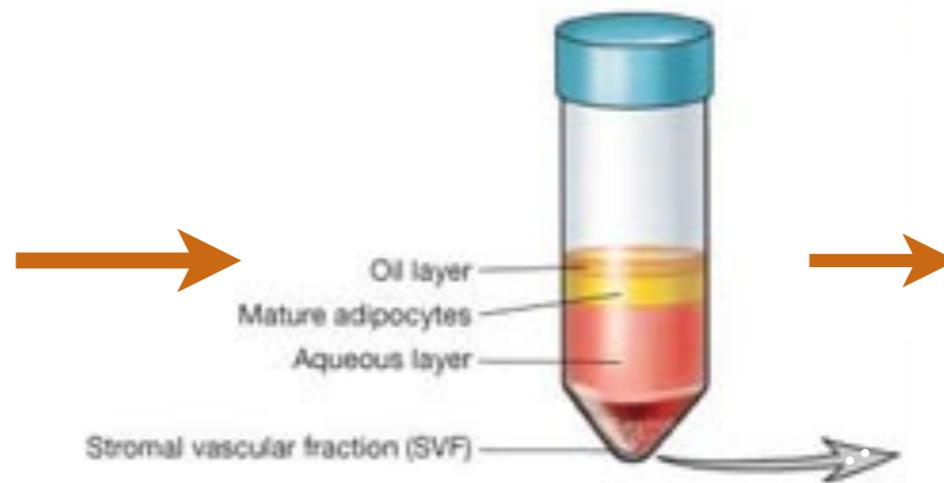


Qué es la SVF ?

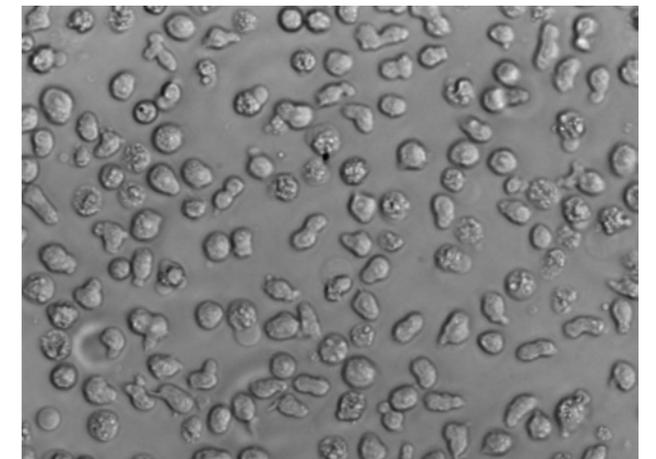
- **Fracción Estromal Vascular (SVF-FVE):** Población heterogénea de distintos tipos celulares obtenidos mediante disociación del tejido adiposo y centrifugación.
- NO contiene adipocitos.
- Células aisladas del componente estromal del tejido.



Tejido Adiposo



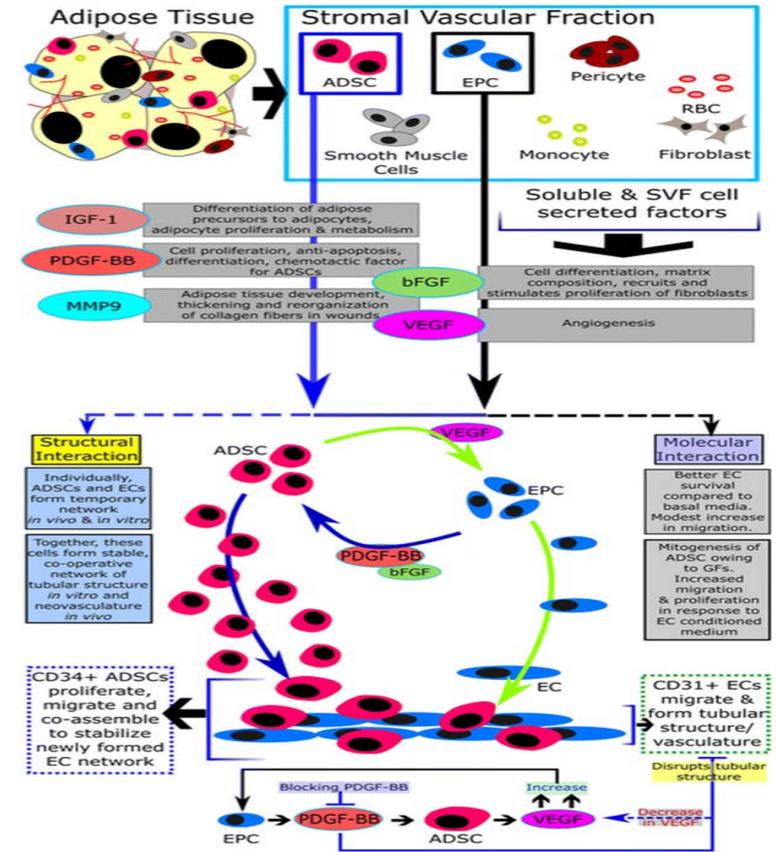
Tejido disociado



Suspensión Celular: SVF

SVF: Propiedades Biológicas

1. Producción Factores Tróficos
2. Capacidad de diferenciación
3. Inmunomodulación
4. Angiogénesis

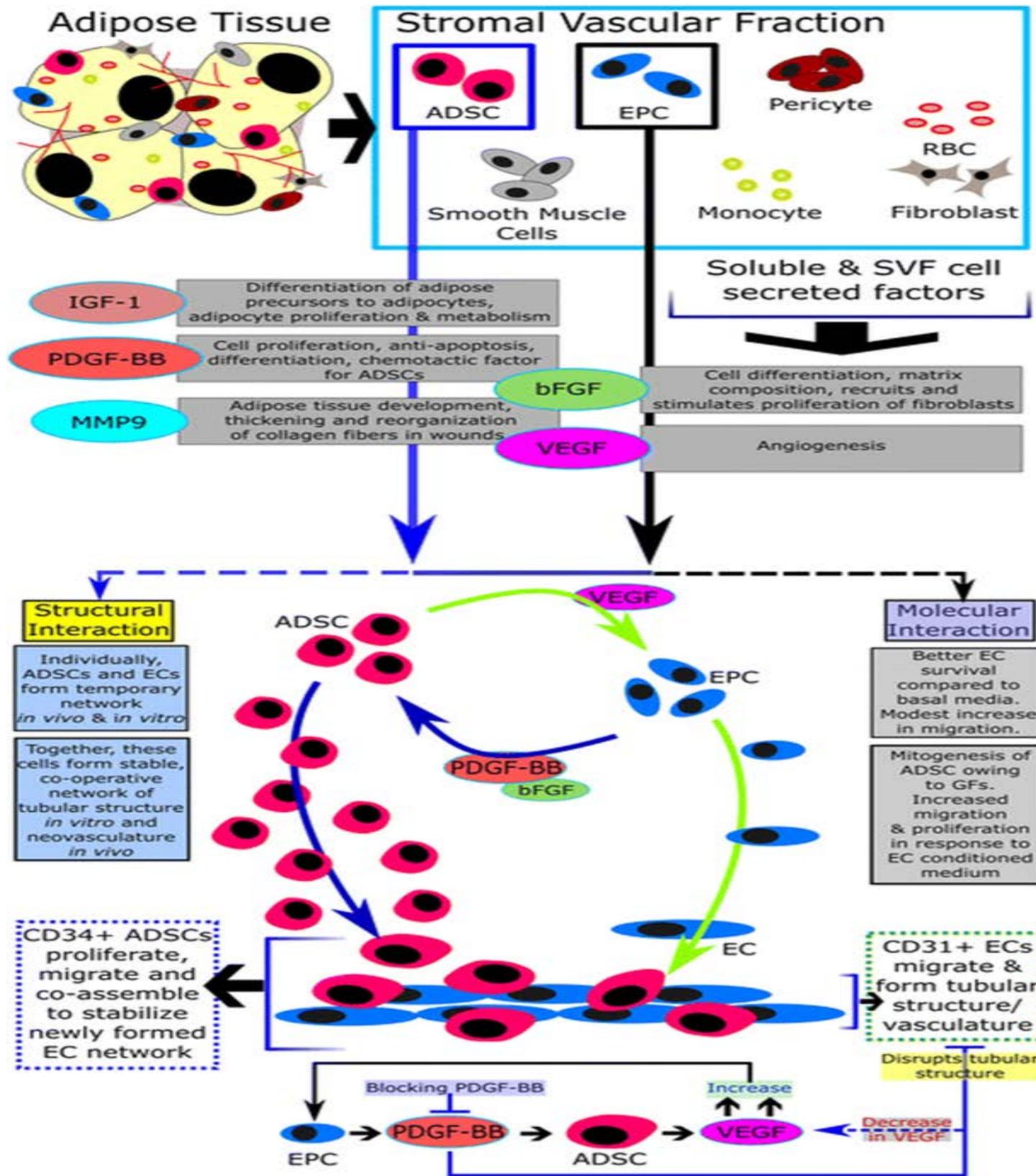


Cell Type

Biological Function

Cell Type	Células Madre Mesenquimales	Células Endoteliales	Fibroblastos	Pericitos	Otros Tipos Celulares
Biological Function	Diferenciación y reparación tisular	Formación vasos sanguíneos	Producción de colágeno	Estabilización nuevos vasos sanguíneos	Funciones Diversas

SVF: Propiedades Biológicas



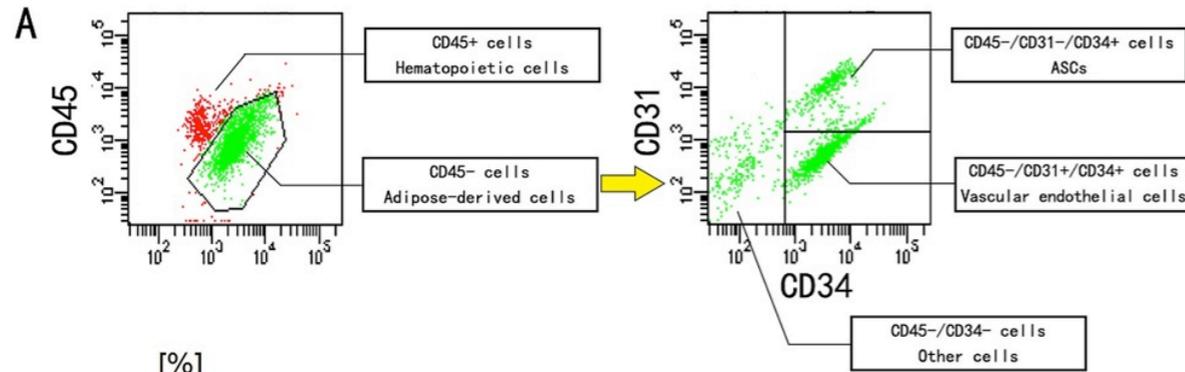
Distintas poblaciones celulares trabajan en conjunto: estructural y molecular mente

Análisis y Caracterización SVF

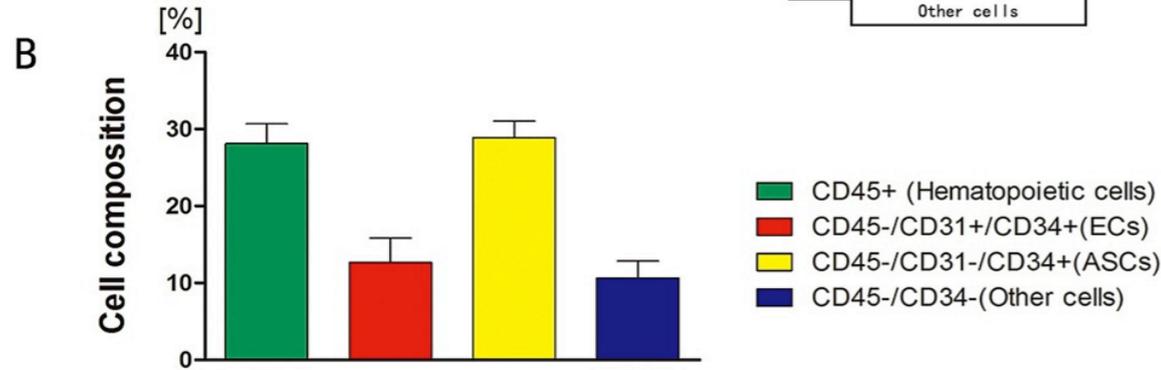
Datos técnicos SVF

Volumen Grasa Procesado	10 - 300 cc
Tiempo del proceso	30-180 minutos
Rendimiento (Células nucleares por gramo)	0,05 - 1,5 millones
Niveles de Endotoxinas (EU/ml)	0-20 EU/ml
Esterilidad (Microbiology: BactAlert)	Negativo
Actividad Colagenasa Residual	≤ 20 CDU/ml
CFU-F Assays	0,1-5 %
Caracterización Celular por citometría de flujo	CD45, CD34, CD31, etc

SVF: Caracterización celular por citometría de flujo



ALTO % de PROGENITORES ESTROMALES (CD34 +)
 BAJAS CANTIDADES DE CÉLULAS SANGUÍNEAS (CD45+)
 BAJOS NIVELES DE ERITROCITOS



Fracción Estromal Vascular

Células derivadas de grasa

CD45-
50-80 %

- Adipose Stromal/Stem Cells
1-10 %
- Mature endothelial cells
5-10 %
- Pericytes and fibroblasts
around 10 %
- Endothelial progenitors
7,3 %

Células hematopoyéticas (sangre):

linfocitos, neutrófilos, macrófagos

CD45+
20-50 %

Fuente de células Tejido Adiposo vs Médula Ósea

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

MSCs Grasa vs MSCs Médula Ósea

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

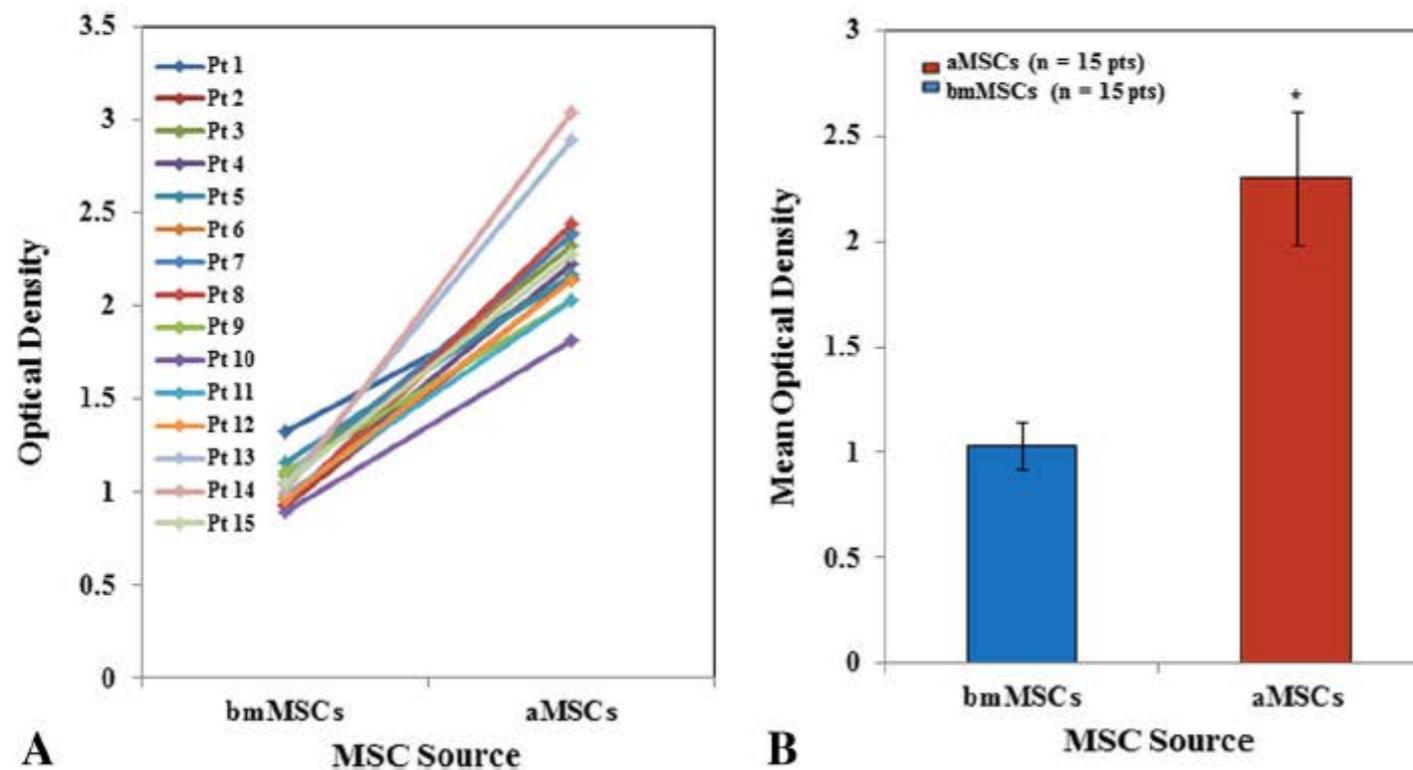
Clinical Orthopaedics
and Related Research®
A Publication of The Association of Bone and Joint Surgeons®



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 ($p < 0.001$).

SVF: Estudios Clínicos

SVF cells show a good safety profile, with valuable clinical results in osteoarthritis: pain and functionality

Treatment options with SVF for OA.

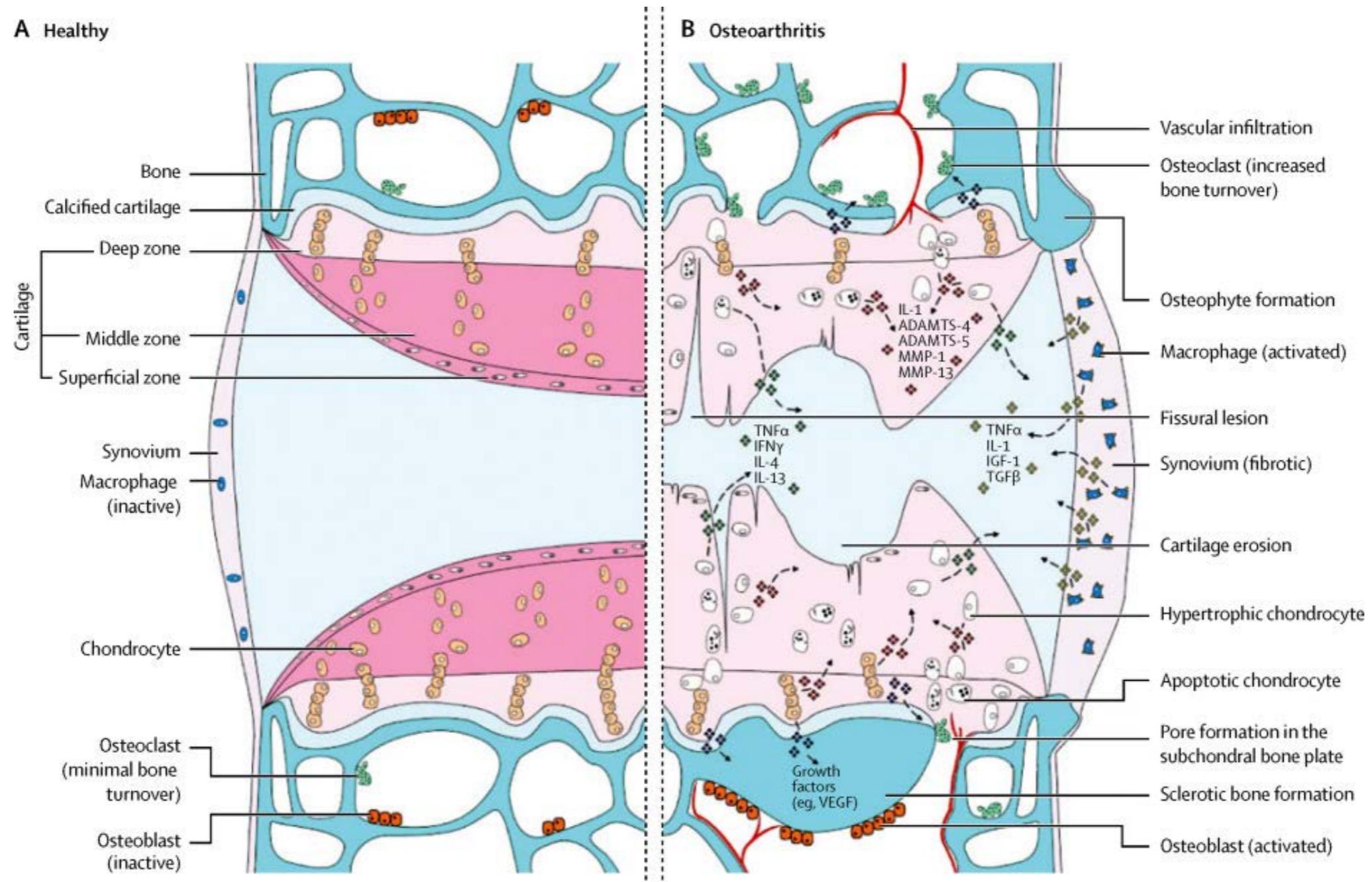
Study design	Duration of study	Intervention treatment	Pain outcome	Results	Reference
Case series	12 weeks post-treatment follow-up	SVF + PRP + HA	VAS; FRI; ROM	MRI confirmation of cartilage regeneration pain, and functional status improved	[84]
Cohort study	Three months	SVF + PRP + HA	Lysholm, Tegner, IKDC	Significant improvement in Lysholm, Tegner, IKDC, no significant cartilage regeneration	[85]
Case series	Two years	SVF + PRP	VAS; WOMAC; Lysholm	VAS/function/MRI improvements	[86]
Comparative study	Two years	SVF + PRP vs. PRP-only group (second-look arthroscopy results)	VAS; KOOS	SVF/PRP group exhibited development than the PRP-only group	[87]
Case series	About 12.7 months	SVF + PRP (second-look arthroscopy results)	Tegner; IKDC	About 94% of patients had excellent clinical improvement	[88]
Comparative study	Twenty-eight months	SVF alone vs. SVF with fibrin glue (second-look arthroscopy results)	Tegner; IKDC ; ICRS	Enhanced Tegner scale and IKDC score in two groups ICRS score were improved in the adipose SVF with fibrin glue group	[89]
Case series	Three months	SVF + HA + PRP	VAS; FRI; ROM	Pain, and functional status improved MRI data confirmed cartilage-like tissue regeneration	[90]

Fotouhi et al., 2018

Fisiopatología Osteoartritis (OA)

Cartílago Sano

Cartílago OA



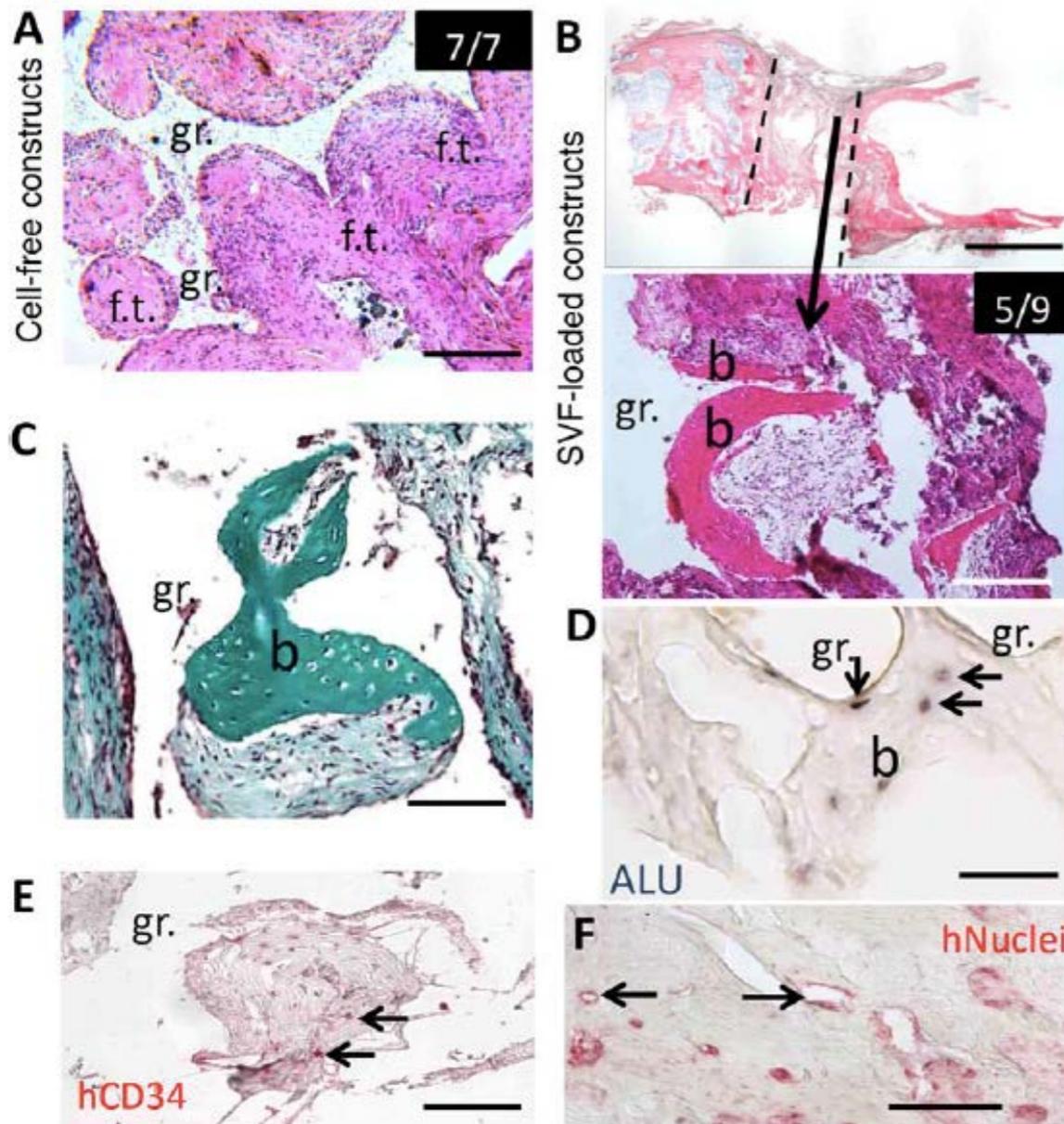
SVF: Mecanismos de acción en Osteoartritis

- **Efecto paracrino** (Factores tróficos:secretoma)
- **Inmunomodulación:** efectos anti-inflamatorios sobre condrocitos y sinoviocitos: IL-10, TGF-B, PGE-2
- Estimulación de la **proliferación de condrocitos**
- **Aumento en la expresión de colágeno** tipo II y proteoglicanos
- **Inhibición de metaloproteasas** (MMPs)
- Influencia sobre la **grasa de Hoffa**
- Mejoran procesos de **angiogénesis**
- **Integración y diferenciación** en condrocitos????
- **Supervivencia a largo plazo**????

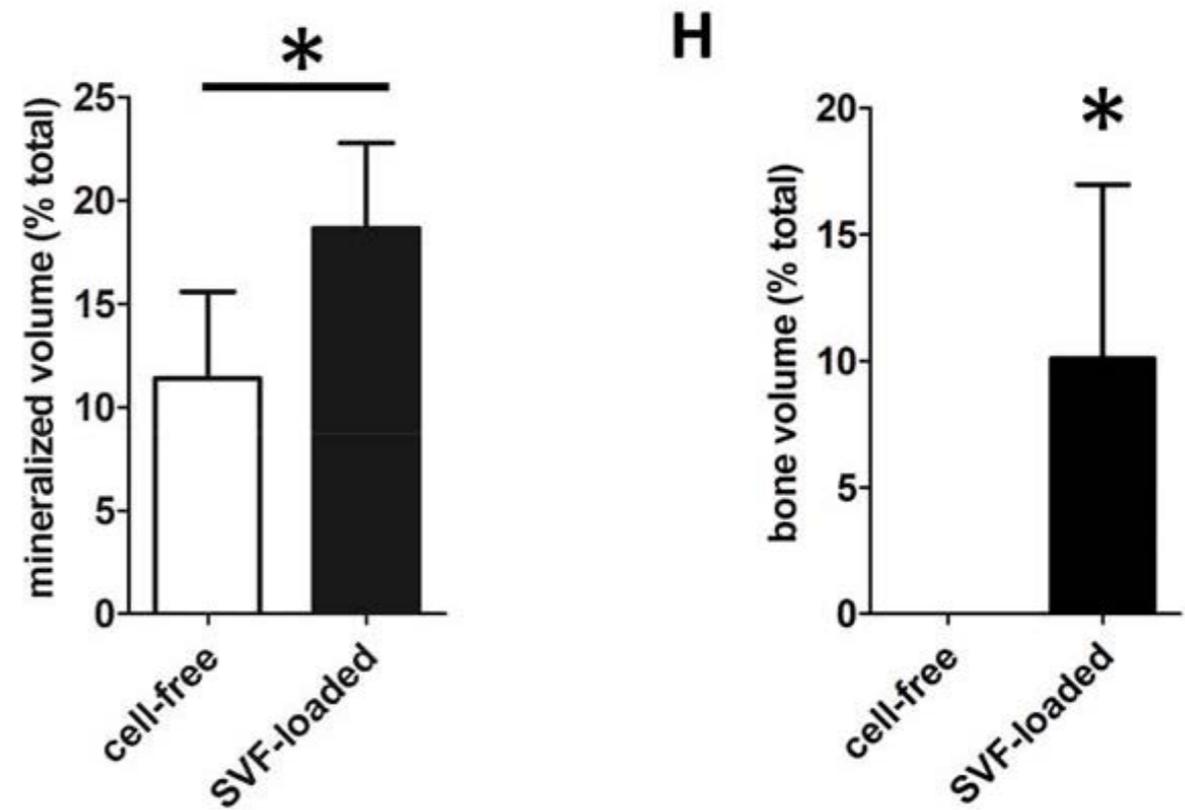
SVF: Uso Clínico en Traumatología

Saxer et al., 2016; Stem Cells

SVF fresh cells (without culture) for new bone tissue with blood vessels in a fracture microenvironment



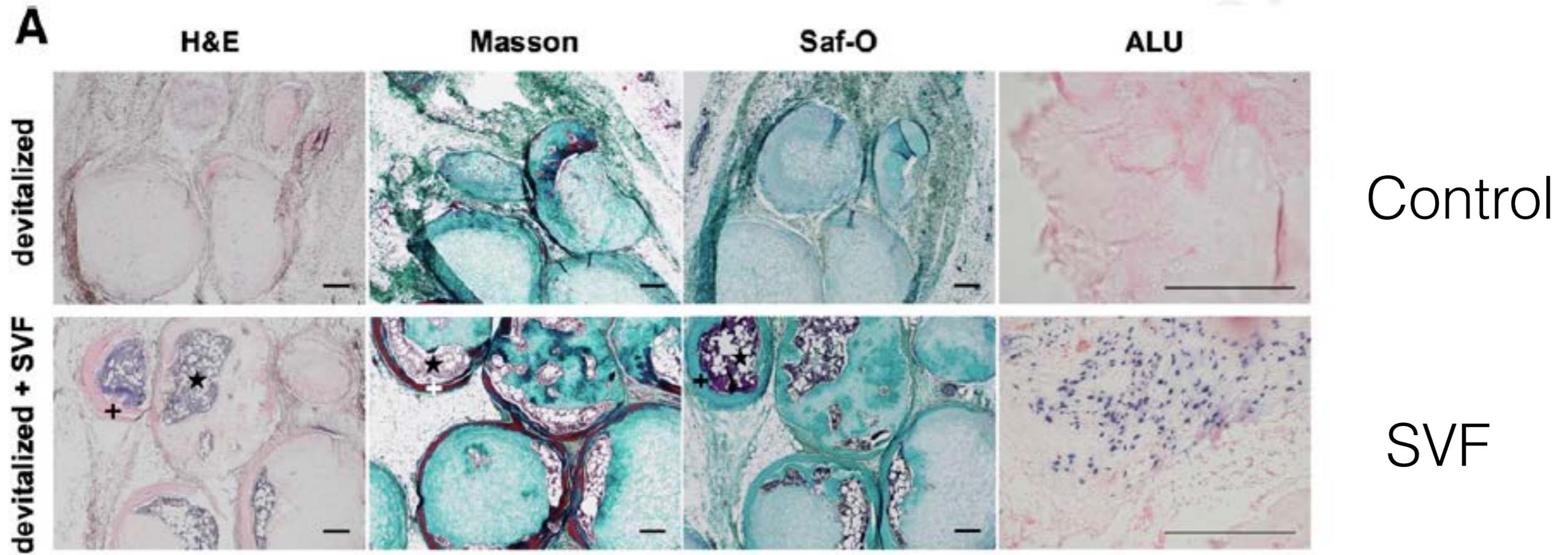
MINERALIZED BONE VOLUME



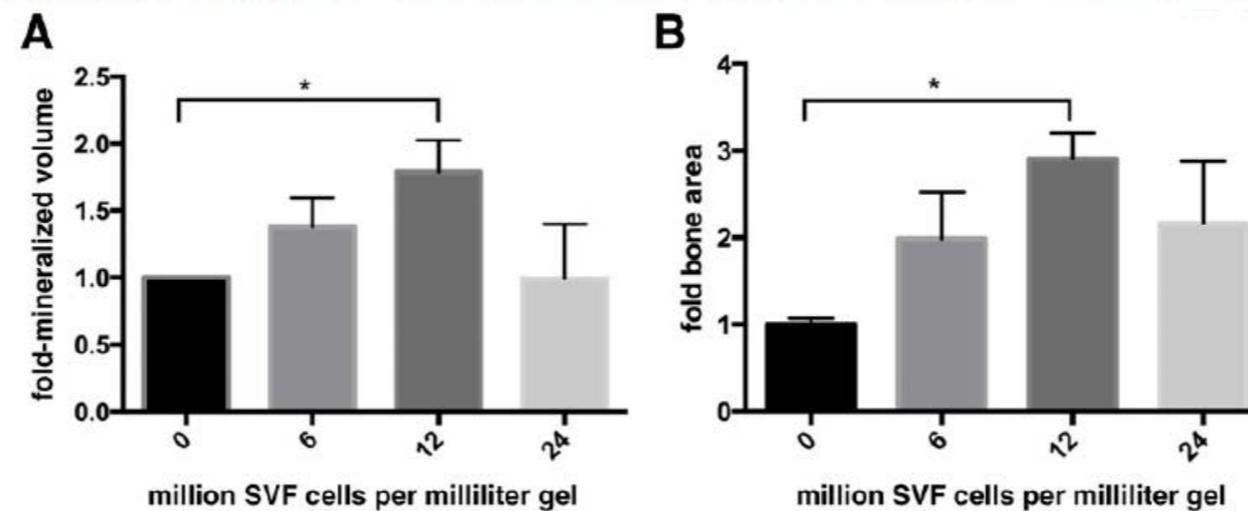
8 weeks

SVF: Uso Clínico en Traumatología

Todorov et al., 2016, Stem Cells Translational Medicine



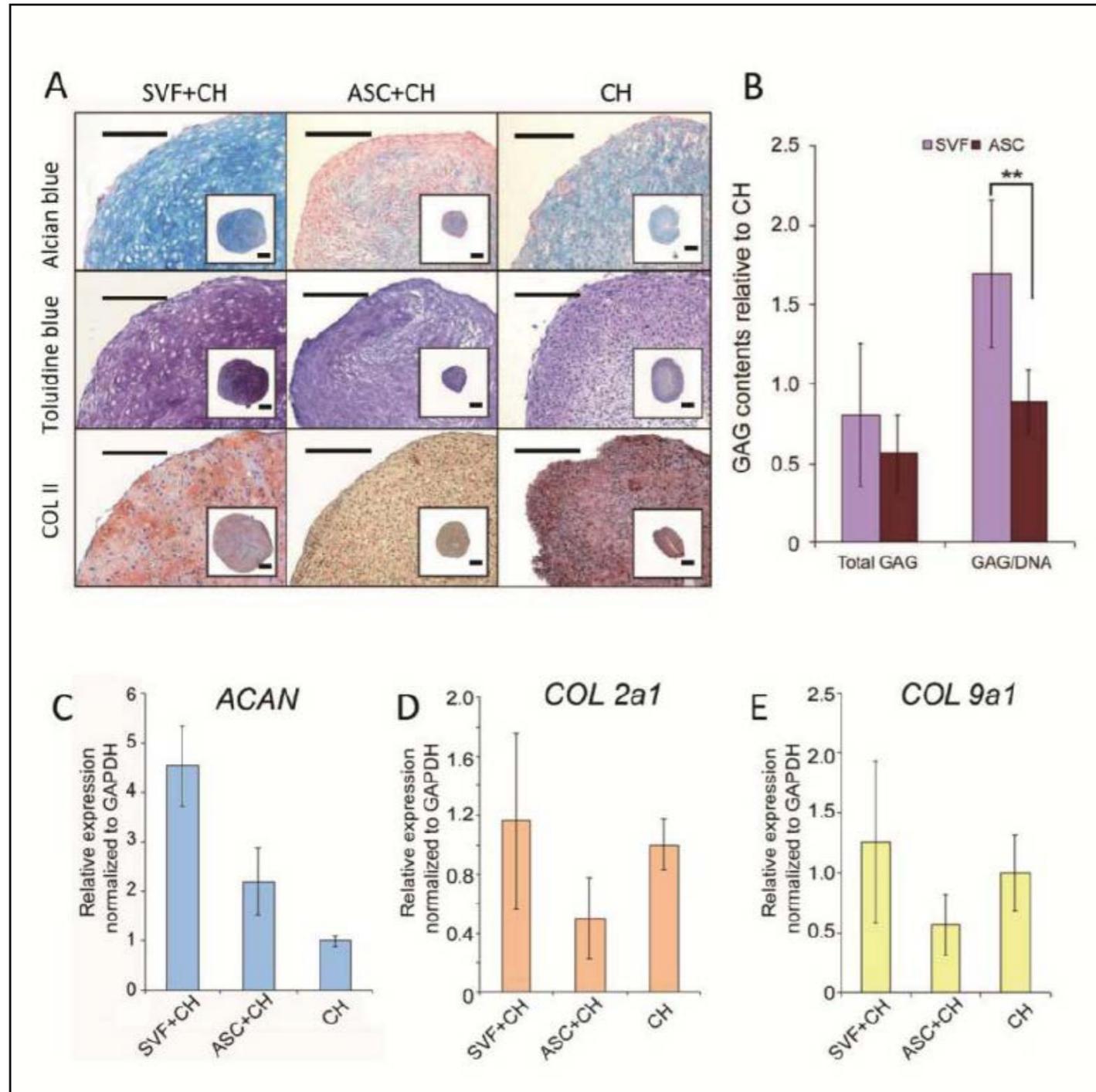
Bone Mineralization



12 weeks

Correlation between mineralized matrix and number of SVF endothelial cells

Células en fresco vs Células Cultivadas: SVF vs ASCs



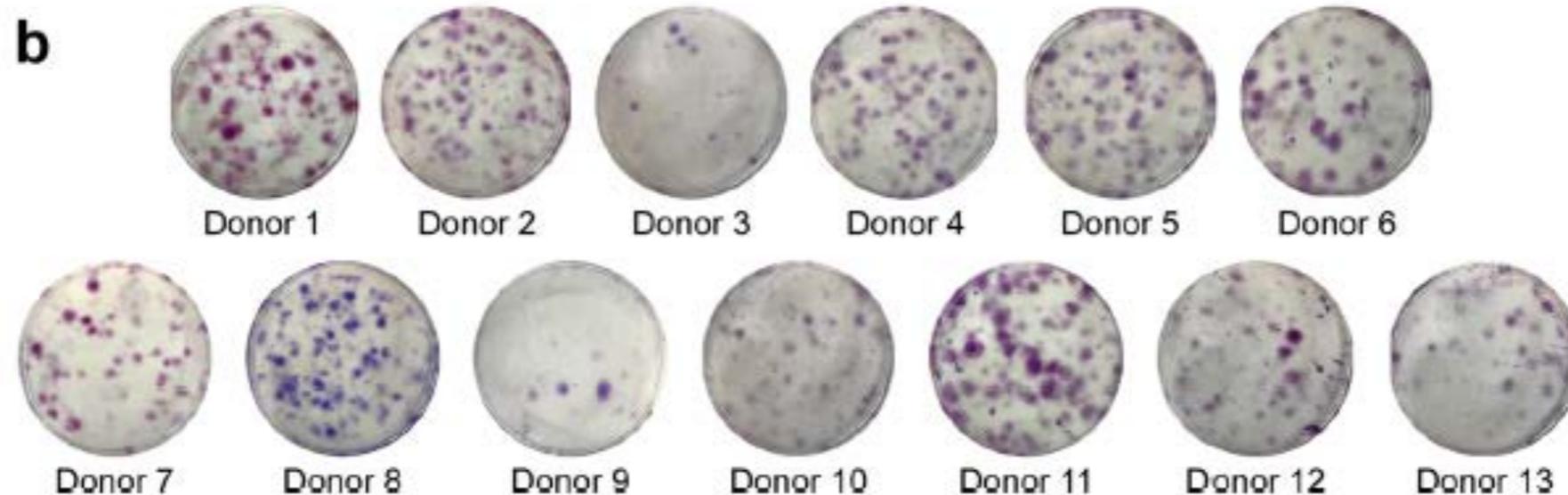
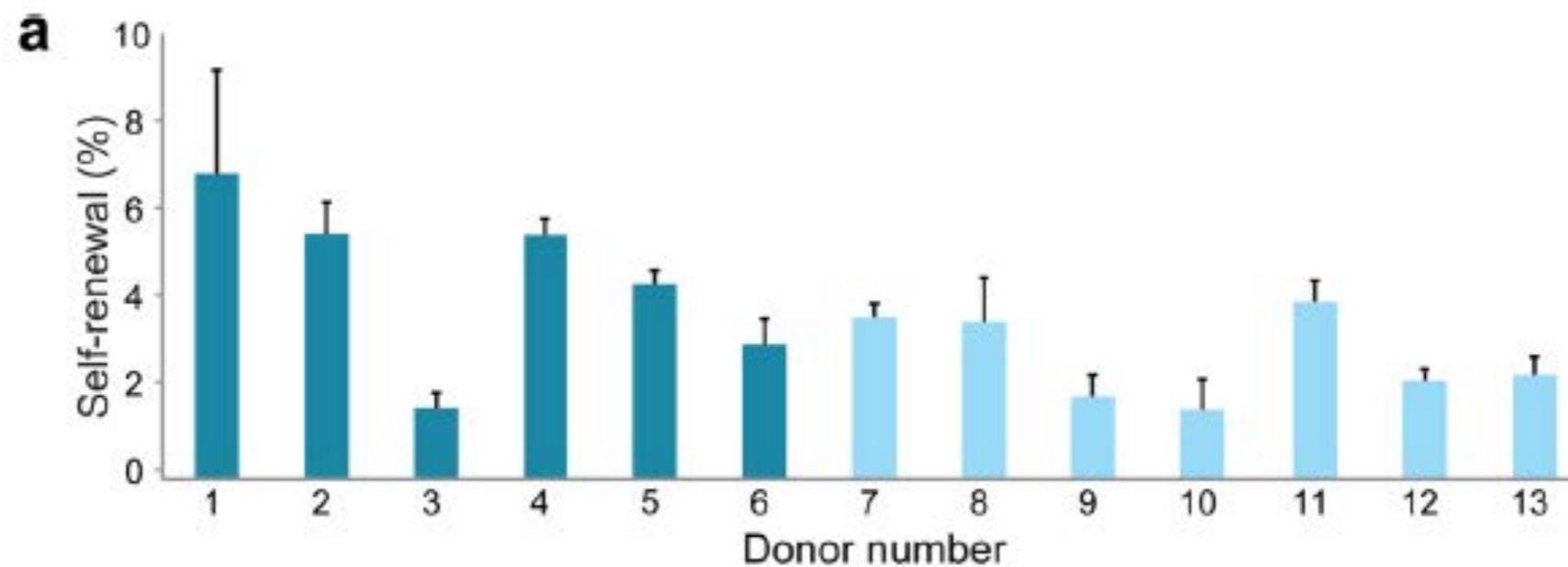
- SVF + condrocitos: más efectivo
- Mayor producción de glucosaminoglucanos glucosaminglycans
- Expresión elevada de colágeno tipo II, tipo IX y agreganos
- SVF superior a células cultivadas - ASCs-

Cultivo Celular pellets
in vitro

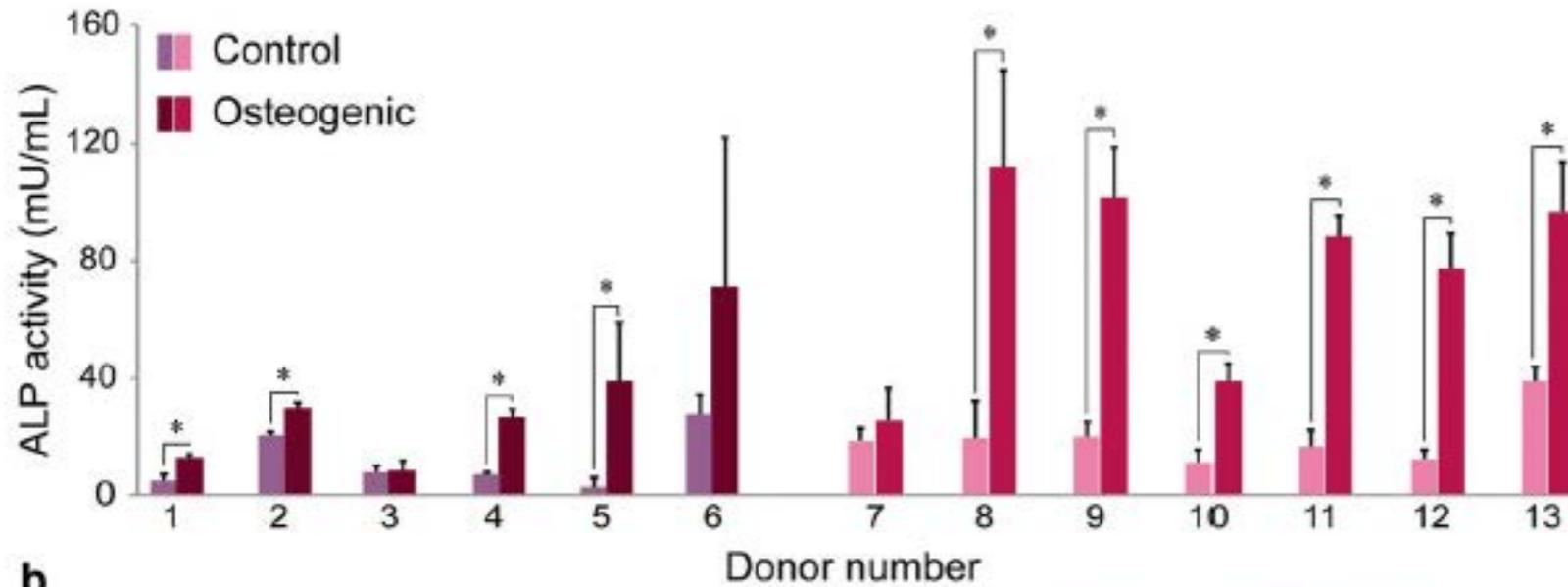
SVF: Variabilidad inter-individual 1

N=13 mujeres, 34-68 años

PROLIFERATION CAPACITY: CFU-F ASSAYS

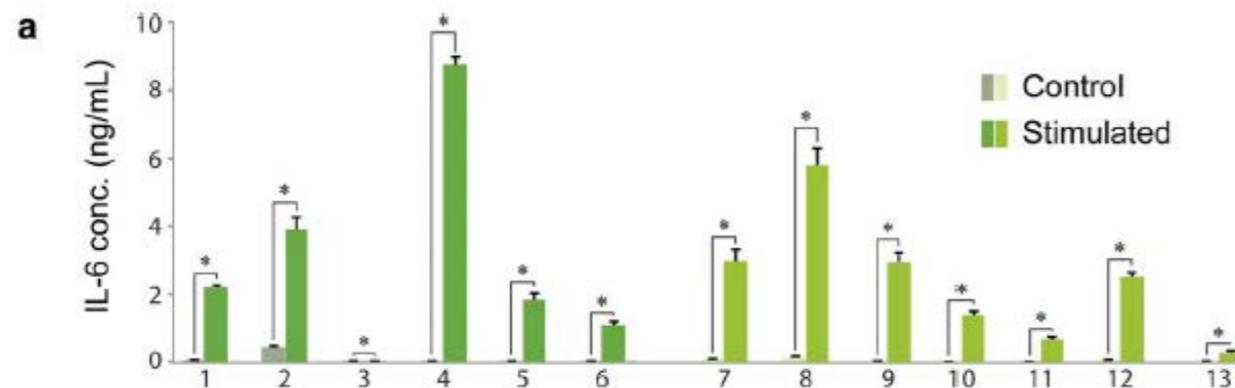


SVF: Variabilidad inter-individual 2

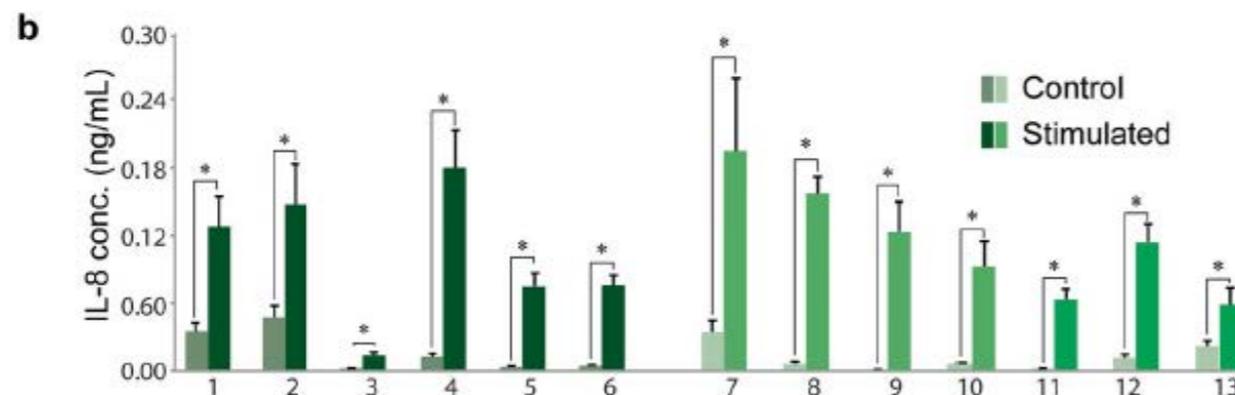


Diferenciación osteogénica

IL-6



IL-8



Producción de citoquinas

Conclusiones / Direcciones Futuras

1. El uso de SVF autólogo inmediato es factible, sin necesidad de cultivo y sin riesgos de rechazo.
2. Importancia of **Ensayos de Calidad y Seguridad**: Contaje celular y caracterización.
3. **Evaluación Clínica**: Resultados con escalas objetivas y controles adecuados
4. El tejido adiposo contiene elevadas cantidades de **MSCs** y otros tipos celulares en comparación con otras fuentes de tejido (necesidad de estudios clínicos comparativos)
5. Todavía existen **variables desconocidas** (dosis, vía de administración, etc). Tenemos algunas pistas.
6. Existe **fuerte evidencia preclínica y clínica** hacia el uso de SVF en humanos

Muchas Gracias
Por su atención

email:

sevedos@yahoo.es