

Obtención de células madre del tejido adiposo y su potencial de diferenciación osteogénico

ADIPOSE TISSUE DERIVED MESENCHYMAL STEM CELLS, ISOLATION AND DIFFERENTIATION INTO THE OSTEOGENIC LINEAGE

Catalina Pineda Molina, Carolina Londoño Peláez^ψ

Laboratorio de Cultivo Tisular. Programa de Ingeniería Biomédica EIA-CES, Línea de Biotecnología en Salud y Biomateriales. Grupo de Investigación en Ingeniería Biomédica EIA-CES (GIBEC), Colombia

Recibido 2 de febrero de 2009. Aceptado 20 de mayo de 2009

Resumen— El tejido adiposo es una de las principales fuentes de células madre de fácil obtención y con alto potencial de diferenciación hacia linajes celulares especializados. Con el objetivo de estandarizar la obtención de estas células y dirigir su diferenciación hacia el linaje osteogénico, se utilizó tejido adiposo procedente de liposucción y de abdominoplastia. Se aplicaron métodos de disgregación mecánica y enzimática del tejido para obtener las células. La morfología celular obtenida fue similar a fibroblastos y a células madre reportadas por otros autores. Se encontró una mayor eficiencia en el procesamiento del lipoaspirado en comparación con el tejido resultante de abdominoplastia, y la disgregación enzimática del tejido permitió una mayor liberación de células y una temprana adhesión al plato de cultivo. La inducción de las células madre derivadas de lipoaspirado hacia el linaje osteogénico permitió la observación, mediante tinción con alizarina roja S, de depósitos de calcio en la matriz extracelular en las células bajo condiciones de diferenciación, pero no en aquellas sin suplementos osteogénicos. Se obtuvieron cultivos de células madre derivadas de lipoaspirado con capacidad de diferenciación hacia el linaje osteogénico, a través de inducción controlada, que podrían ser utilizadas en la ingeniería de tejido óseo.

Palabras clave—Células madre mesenquimatosas, Diferenciación osteogénica, Liposucción, Tejido adiposo.

Abstract— Adipose tissue is one of the main sources of stem cells readily available and with a high potential to differentiate into specific mesenchymal and non-mesenchymal lineages. Therefore, to standardize the collection of these cells, adipose tissue from surgical liposuctions and abdominoplasty was used. Methods of enzymatic and mechanical digestion were used to release the cells. With regard to cell morphology, the cells displayed a fibroblast-like spindle-shaped morphology as cited by other authors. There was a higher efficiency in processing tissue from liposuctions compared with tissue from abdominoplasty. Likewise, the enzymatic digestion allowed faster initial cell adhesion than the mechanical digestion. Finally, calcium deposits were observed by alizarin red staining in cultures under osteogenic conditions, but were absent in cultures lacking osteogenic supplements. In conclusion, isolated adipose-derived stem cells were capable of osteogenic differentiation and therefore with potential applications in bone tissue engineering.

Keywords— Adipose tissue, Liposuction, Mesenchymal stem cells, Osteogenic differentiation.

I. INTRODUCCIÓN

A pesar de la capacidad regenerativa de la mayoría de los tejidos del cuerpo, existen algunas lesiones o enfermedades como el mal de Parkinson, la diabetes mellitus, las alteraciones cardíacas y las enfermedades

osteodegenerativas y nerviosas, que provocan un daño irreversible en las células afectadas, haciendo que el correspondiente órgano o tejido pierda su funcionalidad [1].

En Colombia particularmente, las enfermedades osteodegenerativas como la osteoporosis, la artritis y las

^ψ Dirección para correspondencia: clondono@ces.edu.co

lesiones de los discos articulares o intervertebrales; así como los altos índices de accidentalidad (que para el año 2006 dejaron 94.322 heridos entre leves y graves) [2], que generan lesiones con grandes pérdidas de fragmentos óseos, tienen un efecto devastador en el bienestar y la calidad de vida de los pacientes. Los procedimientos clínicos disponibles, tienen un uso limitado debido a la morbilidad del sitio donante, en el caso de los autoinjertos; o por el rechazo inmune o la baja capacidad regenerativa, en el caso de los aloinjertos o xenoinjertos [3]. Todas estas limitaciones han llevado a la búsqueda de nuevas formas de restituir los procesos biológicos que han resultado afectados, bien mediante el aporte de precursores celulares sanos, en procesos conocidos como terapias celulares, o la aplicación de factores de crecimiento producidos normalmente por tales células [4].

El uso de las células madre (SCs, *Stem Cells*) representa una opción innovadora y prometedora para resolver muchos de los problemas clínicos mencionados [5] asegurando un suficiente número de células específicas del tejido, eliminando la morbilidad del sitio donante y los problemas de rechazo inmunológico [6-7]. Estas células han generado oportunidades significativas para la ingeniería de injertos adecuados para la regeneración de tejidos. Las SCs están definidas como poblaciones celulares que tienen la capacidad de autorenovarse y diferenciarse en uno o más tipos de linajes especializados [8]. El creciente interés sobre las SCs ha creado una disciplina capaz de explorar la regulación de los procesos de diferenciación celular desde las células más primitivas hacia las células completamente diferenciadas como las neuronas, los cardiomiocitos, las células de cartilago y hueso, entre otras [9-10].

Por otra parte, la demostración, tanto experimental como en humanos, de que las células madre adultas (ASCs, *Adult Stem Cells*) obtenidas a partir de tejidos específicos, como la médula ósea, el tejido adiposo y el cordón umbilical, la sangre periférica, el cerebro, los vasos sanguíneos, el músculo esquelético, la córnea, la pulpa dental, el hígado, la piel, el tracto gastrointestinal, el páncreas, tienen una capacidad regenerativa mucho mayor a la que previamente se pensaba, abre un nuevo campo en el área de la medicina regenerativa [7,11-12]. En condiciones normales, en los tejidos específicos, estas células tienen gran capacidad para renovarse después de traumas, enfermedades o envejecimiento [13].

El tejido adiposo se deriva del mesodermo embrionario y contiene un estroma que puede ser aislado con facilidad [14]. Recientemente, se ha demostrado que su fracción estromal contiene células madre

multipotentes (ADAS, *Adipose-Derived Adult Stem Cells*) que pueden diferenciarse hacia linajes específicos tales como adipogénico, condrogénico, osteogénico, miogénico y neurogénico [10,15-19]. La aspiración del tejido adiposo (liposucción) es generalmente mejor aceptado por el público que la de la médula ósea, debido a la percepción de que el excesivo tejido adiposo es poco sano [20]; asimismo, el tejido adiposo es uno de los más abundantes del cuerpo humano, su acceso es sencillo, el procesado es fácil de realizar y en la mayoría de las personas es posible extraer varios mililitros de grasa sin perjuicio estético [21]. La liposucción es uno de los procedimientos estéticos más realizados en el mundo y, aunque su objetivo original consiste en retirar la grasa no deseada, actualmente puede establecerse como la forma ideal de obtener ASCs autólogas para intervenir en la regeneración tisular [22]. En este trabajo se propone la utilización de las células ADAS como fuente para la obtención de células especializadas para la regeneración de tejidos especializados de origen mesenquimal, mostrando el método de obtención de tales células a partir del tejido adiposo y su diferenciación hacia el linaje osteogénico.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Obtención y procesamiento del tejido adiposo

Luego de suscribir un consentimiento informado, se tomaron 24 muestras de tejido adiposo de pacientes de ambos sexos sometidos a liposucciones o abdominoplastias bajo anestesia general.

El procesamiento posterior del tejido adiposo se realizó dentro de las cuatro horas posteriores a la cirugía en el Laboratorio de Cultivo Tisular del convenio EIA-CES. 100 ml de tejido fue lavado con una solución buffer fosfato salino (PBS) y finamente cortado hasta obtener fragmentos de aproximadamente 2 mm³. En este punto, la muestra fue dividida en dos porciones con el fin de determinar el potencial de obtención celular mediante suspensión en PBS y mediante digestión enzimática.

Para llevar a cabo la digestión mecánica se resuspendió el tejido en PBS y se fraccionó aún más (Fig. 1A). Se filtró la solución mediante una membrana de nylon de 70 µm (Falcon, EE.UU.) y se centrifugó a 1200 g durante 10 minutos para obtener el botón celular. La digestión enzimática se realizó mediante colagenasa tipo I (Gibco, EE.UU.) para inducir una lisis diferencial y digerir la matriz extracelular. La solución fue centrifugada a 2500 g durante 10 minutos para obtener el botón celular de la fracción vascular del estroma (Fig.1B).

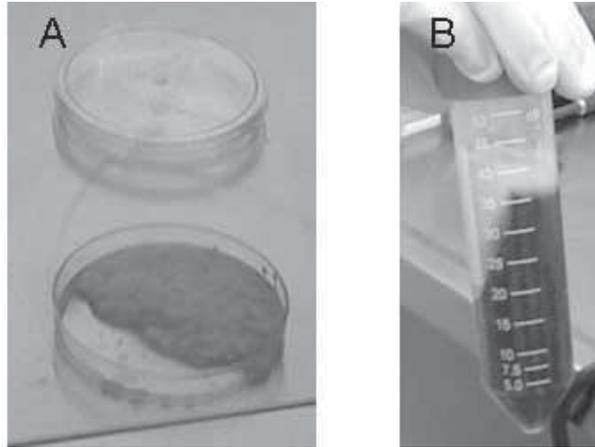


Fig. 1. Procesamiento del tejido adiposo. A) Fragmentación del tejido adiposo. B) Digestión enzimática del tejido adiposo.

2.2 Cultivo celular

Las células, obtenidas por ambos métodos, fueron cultivadas en frascos de cultivo T-25 (25 cm², Falcon, EE.UU) con medio de proliferación, formado por DMEM Ham's F12 (Sigma, Alemania) en una proporción 1:1, suplementado con 10% de suero bovino fetal (FBS) (Gibco, EE.UU) y 1% de solución de antibióticos (100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomycin) (Gibco, EE.UU). Se incubaron a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂ durante 24 horas, tiempo después del cual se realizó el primer cambio de medio para eliminar los eritrocitos residuales. Posteriormente, el medio fue cambiado cada 3 días hasta alcanzar una confluencia del 70%.

La morfología, adherencia y proliferación celular se comprobaron mediante microscopía de contraste de fases (Nikon, Japón).

2.3 Diferenciación celular

Para realizar los ensayos de diferenciación se utilizaron células de tercer pase. Se realizó un experimento donde se evaluó la diferenciación luego de 7, 14 y 23 días de cultivo, con tres réplicas cada uno.

Cuando las células ADAS alcanzaron un 70% de confluencia, éstas fueron subcultivadas en platos de 12 pozos (Cellstar, Alemania), con medio de proliferación. Una vez se aproximaron nuevamente a una alta confluencia, el medio se suplementó con los factores de inducción osteogénica dexametasona 100 nM (Sigma, Alemania), ácido ascórbico 50 µM (Sigma, Alemania) y β-glicerol fosfato 10 mM (Sigma, Alemania). Como control negativo, se utilizaron cultivos de células ADAS en medio de proliferación.

2.4 Determinación de calcio extracelular

Las células cultivadas y diferenciadas al linaje osteogénico, fueron fijadas con etanol y teñidas con ARS al 2%. Luego, fueron lavadas repetidamente con agua grado mili-Q estéril y observadas bajo microscopio de contraste de fases. El análisis cualitativo se basó en la intensidad de la tinción y la extensión de las zonas rojas indicativas de los depósitos de calcio.

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En Latinoamérica y especialmente en Colombia, los procedimientos relacionados con la terapia celular y el conocimiento de la biología de las SCs están en sus fases iniciales. Diversos grupos de investigación han abordado el tema y han realizado trabajos que permiten el establecimiento celular a partir de distintas fuentes como la médula ósea, el cordón umbilical y embriones humanos:

El grupo de investigación en inmunología y biología celular, de la Pontificia Universidad Javeriana de Bogotá, ha trabajado en el establecimiento de cultivos de MSCs de la médula ósea (*Bone Marrow Stem Cells*, BMSCs) y de la sangre de cordón umbilical (*Umbilical Cord Stem Cells*, UCBSCs), encontrando una mayor eficiencia en la obtención de BMSCs (100%) frente a las de UCBSCs (30%), a pesar de la influencia que pudiera tener la edad avanzada de los donantes sobre el potencial de proliferación celular [23].

En el centro colombiano de fertilidad y esterilidad CECOLFES han centrado sus investigaciones en la obtención y caracterización de células madre embrionarias humanas para la obtención de células del linaje cardíaco [24]. Con respecto a esta fuente, existe un debate ético que se genera por la destrucción de los embriones y el potencial tumorigénico que éstas presentan cuando son implantadas [25].

Sin embargo, son pocos los trabajos reportados hasta ahora que involucran el uso del tejido adiposo como fuente para la obtención de SCs. En el Laboratorio de Bioquímica Clínica de Sao Paulo, establecieron protocolos para el aislamiento de células a partir de esta fuente y analizaron el rendimiento en la obtención de células ADAS según la topología de las áreas donantes. En los resultados preliminares, estos investigadores encontraron una mayor eficiencia en el tejido adiposo obtenido a partir del tronco [26].

Finalmente, el grupo de investigación de biología de células madre de la Universidad Nacional de Colombia, ha reportado estudios comparativos del potencial terapéutico de las BMSCs y las células ADAS cultivadas

en condiciones de normoxia e hipoxia, para analizar la expresión génica y la presencia de un grupo de factores que modulan los procesos de neovascularización en estas condiciones [27].

En ninguno de los casos mencionados se utilizó el tejido adiposo como fuente para intentar acercamientos hacia la terapia celular como tratamiento para enfermedades del sistema óseo. El desarrollo de la investigación, por lo tanto, permite un avance importante en la consolidación de esta área en el país y en Latinoamérica.

Las muestras utilizadas para la estandarización del protocolo constituyen una fuente de SCs apropiada para fines investigativos, fundamentalmente debido a que no poseen limitaciones éticas en su uso, y porque se derivan de muestras de tejido adiposo que generalmente es desechado luego de los procedimientos quirúrgicos relacionados. De esta forma, se hace innecesaria la búsqueda de otras fuentes más difíciles y dolorosas de obtener, que representan un mayor riesgo para los pacientes donantes; condiciones que finalmente repercuten en el costo del procedimiento. Además, cabe destacar que en los últimos años las liposucciones con fines estéticos han tenido un creciente interés dentro de la población local [28], son cirugías reconocidas en el medio y seguras [29]; los pacientes que se las practican son cada vez más numerosos y acuden al procedimiento para mejorar su condición física más que por enfermedad, con lo cual se asegura la calidad de las muestras y un tejido sano para ser procesado.

3.1 Obtención y procesamiento del tejido adiposo

Como resultado de las extracciones celulares, se encontró que el tejido obtenido mediante lipoaspirado permite la liberación de un mayor número de células con la morfología deseada. Además, debido al estado viscoso del tejido, se facilitan los procesos de disgregación de éste. Por el contrario, el tejido proveniente de abdominoplastia requiere un procesamiento más extenso, que incluye la separación del tejido adiposo (hipodérmico) de la dermis y la epidermis, la disgregación mecánica del tejido aislado y finalmente, la liberación de las células.

Con relación a las formas de obtención de las SC se encontró que, por el método de disgregación enzimática se obtiene un número mayor de células adherentes, especialmente con las muestras de lipoaspirado más que con la de abdominoplastia, con alto potencial de proliferación, alcanzando la confluencia celular en aproximadamente dos semanas.

Así mismo, la adherencia de las células obtenidas por disgregación enzimática fue más rápida que con las células obtenidas por disgregación mecánica; probablemente

debido al menor número de eritrocitos presentes en la solución celular final, lo que facilitaría la adherencia de las células de interés. Sin embargo, contrario a estos resultados, Romanov y colaboradores reportaron en experimentos preliminares, que la eficiencia del aislamiento de ADAS bajo las condiciones de obtención mecánica es comparable a la obtenida con métodos enzimáticos, mientras que la eficiencia de adhesión al sustrato fue aún mayor que con la disgregación enzimática [30].

3.2 Cultivo de células ADAS

Los cultivos primarios fueron heterogéneos, junto con las células adherentes de interés fueron aisladas grandes cantidades de eritrocitos (Fig. 2A). Sin embargo, con el cambio del medio, estos eritrocitos fueron removidos del frasco de cultivo, facilitando la identificación de las células ADAS, así como su proliferación.

Bajo las condiciones de cultivo propuestas, se obtuvieron poblaciones celulares heterogéneas: algunas colonias celulares alargadas fenotípicamente similares a los fibroblastos (*fibroblast-like spindle-shaped cells*) (Fig. 2B), como las reportadas en diversos estudios [10,31-32]; y similares, igualmente, a las SCs obtenidas a partir de otras fuentes, tales como la médula ósea contenida en el hueso trabecular [33-34] y el aspirado medular [35].

Además, se observaron otras poblaciones celulares aplanadas irregulares (*flat cells*) (Fig. 2C), mencionadas por pocos autores [20,32], y cuya función y potencial de diferenciación aún no ha sido bien esclarecida. Estas células se hicieron evidentes desde la primera semana de cultivo de todas las muestras obtenidas, y se incrementaron considerablemente en los subcultivos a largo plazo (hasta el pase 5), tal como lo demostraron también Leong y colaboradores [20]. Sin embargo, Izadpanah y colaboradores mostraron este tipo de morfología sólo cuando las células se acercaron al pase 30 [32].

Se hacen necesarios estudios posteriores que permitan caracterizar las dos morfologías celulares encontradas, para determinar sus tasas de proliferación y sus potenciales de diferenciación hacia linajes celulares especializados; ya que como se mencionó anteriormente, aún no se tienen claras las funciones que cumplen las células aplanadas y su nivel de compromiso hacia un estado de diferenciación específico.

La línea celular obtenida podría tener grandes aplicaciones en terapia celular, debido a que constituyen una fuente eficiente para la obtención de células que podrían ser utilizadas para la regeneración de tejidos dañados; lo que las convertiría en una alternativa viable para aquellas enfermedades o traumas que no tienen aún soluciones efectivas o que en Colombia están al alcance de sólo unas pocas personas, debido a los altos

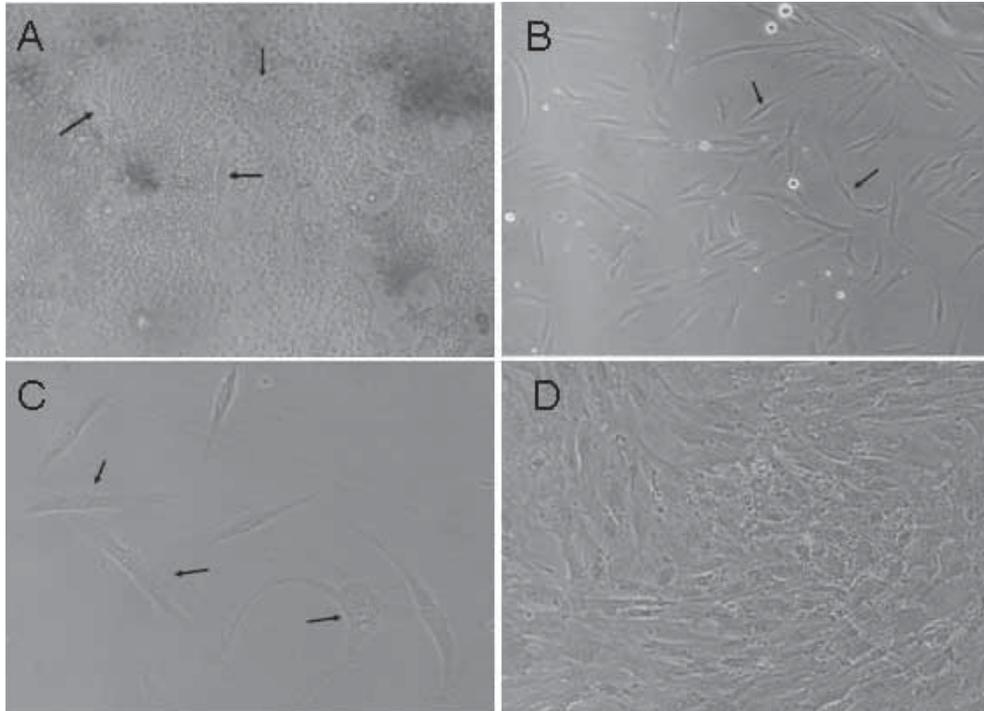


Fig. 2. Cultivo de células ADAS. A) Un día de cultivo previo al lavado con PBS, se observa una alta presencia de eritrocitos suspendidos y algunas células adheridas alargadas; las flechas indican las células adheridas (20X). B) Las flechas indican la forma alargada tipo fibroblasto de las células (10X). C) Las flechas indican la segunda morfología encontrada, las células aplanadas (20X). D) Cambios morfológicos observados en cultivos bajo inducción osteogénica, día 13 de inducción (20X)

costos que representan. De igual forma, estas células se convierten en un buen modelo para la evaluación de diferentes biomateriales que actúan como matrices para la fabricación de sustitutos biológicos, ya que debido a su potencial de diferenciación, podrían representar un buen simulador de tejidos específicos, con el cual se pueden determinar la funcionalidad, citocompatibilidad y genotoxicidad de las células frente al biomaterial.

3.3 Diferenciación de las células ADAS hacia el linaje osteogénico y determinación de calcio extracelular

El tratamiento con los factores de diferenciación genera cambios en la expresión génica de las células promoviendo la osteogénesis. La dexametasona, estimula la proliferación de las MSCs y permite la diferenciación hacia el linaje osteogénico. El β -glicerol fosfato, un fosfato orgánico, también da un soporte a la osteogénesis mediante el control de la mineralización y la actividad de los osteoblastos. Los fosfatos libres pueden inducir la expresión de mRNA y proteínas osteogénicas tales como la osteopontina. El ácido ascórbico desempeña un papel en el incremento de la actividad de la fosfatasa alcalina y promueve la producción de osteocalcina; particularmente,

funciona como un cofactor en la hidroxilación de los residuos de prolina y lisina en el colágeno, e incrementa la síntesis de proteínas no colágenas de la matriz extracelular ósea [36-37], participando de esta forma, en todas las fases de la osteogénesis hasta formar los osteocitos maduros.

Las células ADAS fueron inducidas a diferenciación osteogénica hasta por 23 días; durante este tiempo, las células en presencia de los factores de diferenciación mostraron cambios morfológicos, pasando de una configuración alargada a una configuración poligonal (Fig. 2D), consistente con la morfología osteoblástica producto de la osteogénesis [38].

La determinación de los depósitos de calcio se realizó a los siete, catorce y veintitrés días de diferenciación utilizando ARS. A los siete días de cultivo, se observaron pequeños nódulos de calcio a nivel extracelular, indicando el inicio de la calcificación de la matriz (Fig. 3A), a los catorce y veintitrés días, se observó un incremento en la cantidad y tamaño de los depósitos de calcio (Fig. 3C y 3E). Por el contrario, la tinción con ARS no mostró formación de nódulos calcificados en las células no inducidas en ninguna de estas fechas (Fig. 3B, 3D, 3F).

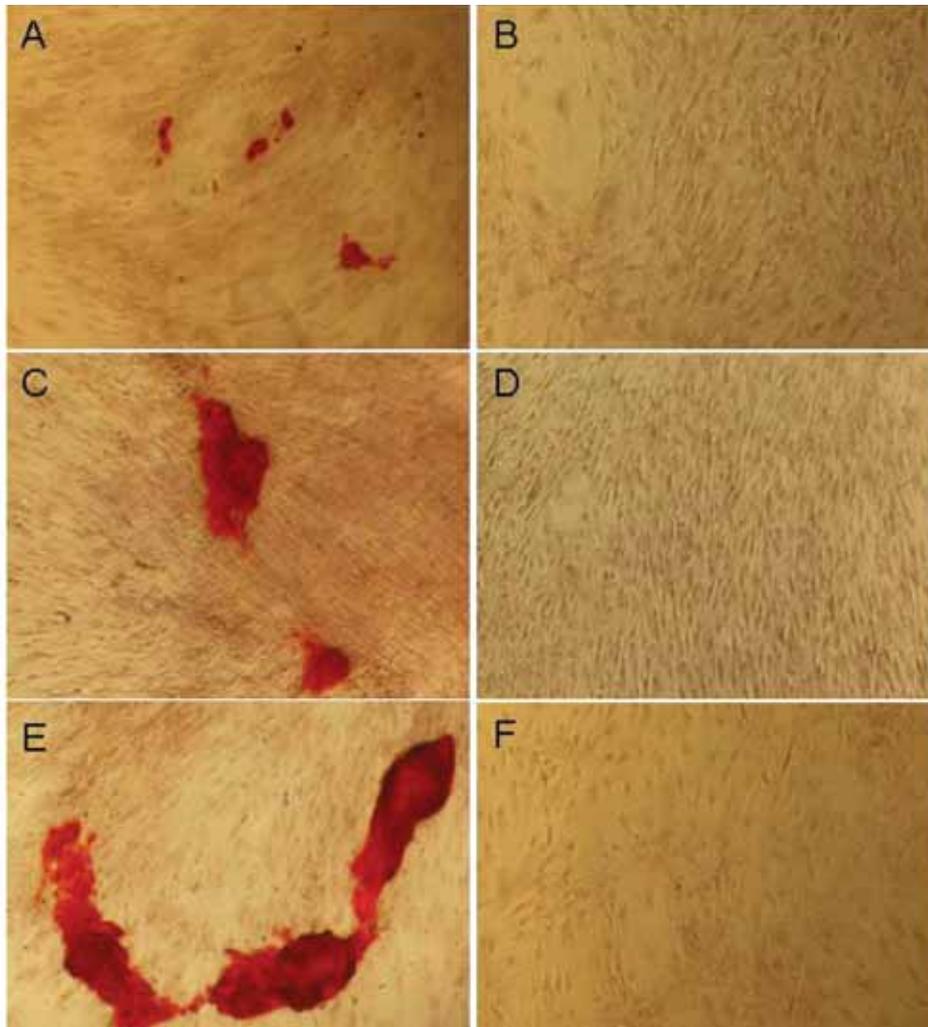


Fig. 3. Determinación de depósitos de calcio en células ADAS. Tinción con ARS en células inducidas (A, C y E) y no inducidas (B, D y F) para los días 7, 14 y 23, respectivamente. Magnificación 10X en todas las imágenes.

IV. CONCLUSIÓN

El desarrollo de la investigación permitió el establecimiento de un protocolo para la extracción de las células ADAS a partir de tejido adiposo obtenido por liposucciones, mediante un método de fácil obtención, con implicaciones éticas menores comparados con otros métodos de extracción, y que produce como resultado células con características indiferenciadas y potencial de proliferación. Las células aisladas constituyen una fuente eficiente para la obtención de células que podrían tener aplicaciones importantes en terapia celular para el tratamiento de algunas enfermedades que implican el daño de células especializadas de un tejido.

Los resultados de diferenciación de las células ADAS hacia el linaje osteogénico permitieron identificar el potencial de estas células en la formación de tejido óseo, bajo inducción controlada. Para establecer su potencial en

la regeneración de tejidos funcionales, se hacen necesarios estudios posteriores que permitan validar con técnicas cuantitativas, la capacidad de expresión de proteínas osteogénicas de las células inducidas.

El desarrollo de trabajos que involucren la utilización de células ADAS para terapia celular dirigida al tratamiento de enfermedades osteogénicas, permitirá un avance en el campo de la ortopedia y de la biología de las SCs en Colombia y en Latinoamérica.

Finalmente, se espera realizar una fase de caracterización fenotípica de las células diferenciadas hacia el linaje osteogénico, así como estudios de diferenciación adipogénica y condrogénica, con el fin de determinar el potencial de las células ADAS obtenidas para generar tejidos diferenciados específicos; que puedan ser utilizados en el tratamiento de enfermedades osteodegenerativas, en cáncer de tejidos blandos o en enfermedades articulares.

REFERENCIAS

- [1] Mínguez A., Escamilla F. Terapia celular y otras estrategias neuroregenerativas en la enfermedad de Parkinson (I). *Revista neurológica*, 41, 604-614, 2005.
- [2] Accidentalidad vial en Colombia. Información para el desarrollo de una cultura vial. Fondo de Prevención Vial (2006). Consultado el 10 de febrero de 2009 en: http://www.fonprevial.org.co/index.php?option=com_content&view=article&id=24&Itemid=65
- [3] Estrada C., Paz A.C., López L.E. Ingeniería de tejido óseo: consideraciones básicas. *Revista EIA*, 5, 93-100, 2006.
- [4] Prósper F., Gaviria J.J., Herreros J., Rábago G., Luquin R., Moreno J., Robles J.E., Redondo P. Trasplante celular y terapia regenerativa con células. *Anales del sistema sanitario de Navarra*, 29, 219-234, 2006.
- [5] Pu L.L.Q., Cui X., Fink B.F., Gao D., Vasconez H.C. Adipose aspirates as a source for human processed lipoaspirated cells after optimal cryopreservation. *Plastic and reconstructive Surgery*, 117, 1845-1850, 2006.
- [6] Ringe J., Kaps C., Burmester G.R., Sitterling M. Stem cells for regenerative medicine: advances in the engineering of tissues and organs. *Naturwissenschaften*, 89, 338-351, 2002.
- [7] Zuk P.A., Zhu M., Ashjian P., De Ugarte D.A., Huang J.I., Mizuno H., Alfonso Z.C., Fraser J.K., Benhaim P., Hedrick M.H. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Molecular biology of the cell*, 13, 4279-4295, 2002.
- [8] Bunnell B.A., Deng W., Robinson C.M., Waldron PR, Bivalacqua TJ, Baber SR, Hyman AL, Kadowitz PJ. Potential application for mesenchymal stem cells in the treatment of cardiovascular diseases. *Canadian journal of physiology and pharmacology*, 83, 529-539, 2005.
- [9] Freshney R.I., Stacey G.N., Auerbach J.M. Culture of specialized cells. Culture of human stem cells. John Wiley & Sons, Inc, 369, Capítulo 5-7, 2007.
- [10] Zuk P.A., Zhu M., Mizuno H., Huang J., Futrell W., Katz A.J., Benhaim P., Lorenz P., Hedrick M.H. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Engineering*, 7, 211-228, 2001.
- [11] Niemeyer N., Kornacker M., Mehlhorn A.T., Seckinger A., Vohrer J., Schmal H., Kasten P., Eckstein V., Südkamp N.P., Krause U. Comparison of immunological properties of bone marrow stromal cells and adipose tissue-derived stem cells before and after osteogenic differentiation in vitro. *Tissue Engineering*, 13, 111-121, 2007.
- [12] Cancedda R., Mastrogiacomo M., Bianchi G., Derubeis A., Muraglia A., Quarto R. Bone marrow stromal cells and their use in regenerating bone. *Tissue Engineering of Cartilage and Bone: Novartis Foundation Symposium. UK: John Wiley & Sons Ltd*, 243, 2003.
- [13] Pittenger M.F., Mackay A.M., Beck S.C., Jaiswal R.K., Douglas R., Mosca J.D., Moorman M.A., Simonetti D.W., Craig S., Marshak D.R. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 284, 143-147, 1999.
- [14] Londono C., Büscher D., Beraza A., Abad J.L., Camarillo E. Obtención de células madre inmortalizadas derivadas de lipoaspirado para su diferenciación hacia diferentes linajes. CLAIB 2007, *IFMBE Proceedings*, 18, 667-670, 2007.
- [15] Mizuno H., Zuk P.A., Zhu M., Lorenz H.P., Benhaim P., Hedrick M.H. Myogenic differentiation by human processed lipoaspirate cells. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 109, 199-209, 2002.
- [16] Huang J.I., Beanes S., Zhu M., Lorenz H.P., Hedrick M.H., Prosper B., Adam K. Rat Extramedullary adipose tissue as a source of osteochondrogenic progenitor cells. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 109, 1033-1041, 2002.
- [17] Huang J.I., Zuk P.A., Jones N.F. Chondrogenic potential of multipotential cells from human adipose tissue. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 113, 585-594, 2004.
- [18] Weinzierl K., Hemprich A., Frerich B. Bone engineering with adipose tissue derived stromal cells. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*, 34, 466-471, 2006.
- [19] Ashjian P.H., Elbarbary A.S., Edmonds B., Deugarte D., Min Z., Zuk P., Lorenz H.P., Benhaim P., Hedrick M.H. In vitro differentiation of human processed lipoaspirate cells into early neural progenitors. *Plastic and reconstructive surgery*, 111, 1922-1931, 2003.
- [20] Leong D.T., Khor W.M., Chew F.T., Lim T.C., Huttmacher D.W. Characterization of osteogenically induced adipose tissue-derived precursor cells in 2-dimensional and 3-dimensional environments. *Cells tissues organs*, 182, 1-11, 2006.
- [21] De Ugarte D.A., Morizono K., Elbarbary A., Alfonso Z., Zuk P.A., Zhu M., Dragoo J.L., Ashjian P., Thomas B., Benhaim P., Chen I., Fraser J., Hedrick M.H. Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow. *Cells tissues organs*, 174, 101-109, 2003.
- [22] Coleman W.P., Hendry S.L. Principles of liposuction. *Seminars in cutaneous medicine and surgery*, 25, 138-144, 2006.
- [23] Páez Guerrero D., Arévalo Romero J., Rodríguez Pardo V.M. Evaluación de características morfológicas e inmunofenotipo de células madre mesenquimales en cultivo obtenidas a partir de sangre de cordón umbilical y médula ósea. *NOVA - Publicación científica en ciencias biomédicas*, 5, 101-212, 2007.
- [24] Lucena C. Obtención y caracterización de la primera línea de células madre embrionaria humana latinoamericana. Memorias del Congreso Internacional de Ciencias Biomédicas. La medicina del siglo XXI, Bogotá, Colombia, 2009.
- [25] Gimble J.M., Guilak F. Adipose-derived adult stem cells: isolation, characterization, and differentiation potential. *Cytotherapy*, 5, 362-369, 2003.
- [26] Almeida K.A., Campa A., Alonso-Vale M.I.C., Lima F.B., Daud, E.D., Stocchero I.N. Fracción vascular estromal de tejido adiposo: cómo obtener células madre y su rendimiento de acuerdo a la topografía de las áreas donantes: estudio preliminar. *Cirugía plástica ibero-latinoamericana*, 34, 71-79, 2008.
- [27] Chaparro O. Células madre mesenquimales y su aplicación en angiogénesis terapéutica. Memorias del Congreso Internacional de Ciencias Biomédicas. La medicina del siglo XXI, Bogotá, Colombia, 2009.
- [28] Rangel A.M. Restricciones al comercio de servicios de salud. Archivos de economía. República de Colombia. Departamento Nacional de Planeación. Dirección de estudios económicos, 61, Documento 267, 2004.
- [29] Wolff Hidárraga G.A., Restrepo L.M., Eusse J.C., Eraso F.F. Determinación del perfil metabólico mediante la cuantificación

- de parámetros clínicos y de laboratorio antes del procedimiento, en las primeras 24 horas y durante los tres meses posoperatorios en pacientes sometidos a liposucción de moderado volumen. *Suplemento Iatreia Revista Médica Universidad de Antioquia*, 21, S14, 2008.
- [30] Romanov Y.A., Darevskaya A.N., Merzlikina N.V., Buravkova L.B. Mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue: isolation, characterization, and differentiation potentialities. *Cell Technologies in Biology and Medicine*, 3, 158-163, 2005.
- [31] Hauner H., Entenmann G., Wabitsch M., Gaillard D., Ailhaud G., Negrel R., Pfeiffer E.F. Promoting effect of glucocorticoids on the differentiation of human adipocyte precursor cells cultured in a chemically defined medium. *Journal of clinical investigation*, 84, 1663-1670, 1989.
- [32] Izadpanah R., Trygg C., Patel B., Kriedt C., Dufour J., Gimble J.M., Bunnell B.A. Biologic properties of mesenchymal stem cells derived from bone marrow and adipose tissue. *Journal of cellular biochemistry*, 99, 1285–1297, 2006.
- [33] Pineda C., García F., Jaramillo L., López L.E., Hansford D., Gallego D., Higueta N., Agudelo P., Sarassa C. Obtención de células madre mesenquimatosas de la médula ósea humana y su potencial uso como modelo de evaluación de biomateriales. Memorias del III simposio sobre biofábricas: La biotecnología como herramienta para el desarrollo y el bienestar, Medellín, Colombia, 2005.
- [34] Tuli R., Tuli S., Nandi S., Wang M.L., Alexander P.G., Haleem-Smith H., Hozack W.J., Manner P.A., Danielson K.G., Tuan R.S. Characterization of multipotential progenitor cells derived from human trabecular bone. *Stem Cells*, 21, 681-693, 2003.
- [35] Kotobuki N., Hirose M., Takakura Y., Ohgushi H. Cultured autologous human cells for hard tissue regeneration: Preparation and characterization of mesenchymal stem cells from bone marrow. *Artificial Organs*, 28, 33-39, 2004.
- [36] Tuan R.S., Boland G., Tuli R. Adult mesenchymal stem cells and cell-based tissue engineering. *Arthritis Research Therapy*, 5, 32-45, 2003.
- [37] Lee J.A., Parrett B., Conejero J.A., Laser J., Chen J., Kogon A.J., Nanda D., Grant R.T., Breitbart A.S. Biological alchemy: engineering bone and fat from fat-derived stem cells. *Annals of Plastic Surgery*, 50, 610–617, 2003.
- [38] Quiroz G.F., Posada O.M., Gallego D., Higueta N., Sarassa C.A., Hansford D.J., Agudelo P., López L.E. Isolation of human bone marrow mesenchymal stem cells and evaluation of their osteogenic potential. *Revista Ingeniería Biomédica*, 2, 48-55, 2008.