



**PROTOCOLO PARA EL AISLAMIENTO DE CÉLULAS  
DE FRACCIÓN ESTROMAL VASCULAR DERIVADAS  
DE TEJIDO ADIPOSO**

## **INDICE:**

- 1. OBJETIVOS**
- 2. NORMAS DE SEGURIDAD Y CONSIDERACIONES IMPORTANTES**
- 3. LISTA DE MATERIALES**
- 4. EQUIPOS**
- 5. PREPARACIÓN DEL ÁREA DE TRABAJO Y DOCUMENTACIÓN**
- 6. LAVADO DE LAS MUESTRAS DE TEJIDO COLECTADAS**
- 7. DIGESTIÓN ENZIMÁTICA**
- 8. CENTRIFUGADO**
- 9. SUSPENSIÓN DE LAS CÉLULAS EN PLASMA RICO EN FACTORES DE CRECIMIENTO PLAQUETARIO Y FILTRADO**
- 10.FOTO-ACTIVACIÓN**
- 11.REINTEGRACIÓN**

## **1. OBJETIVOS DEL PROCEDIMIENTO.**

- Familiarización con las soluciones, los kits y los equipos necesarios para realizar el protocolo de aislamiento de células de fracción estromal vascular.
- Adquirir capacidad para la operación y programación de los equipos a utilizar.
- Comprensión y seguimiento del protocolo Cellgenic para el aislamiento y obtención de células.

## **2. NORMAS DE SEGURIDAD Y CONSIDERACIONES IMPORTANTES**

- Trabaje siempre dentro de la campana de flujo laminar para evitar la contaminación.
- Limpie la campana de flujo laminar periódicamente durante el procedimiento para mantener un ambiente aséptico.
- Durante el lavado y la centrifugación, asegúrese de eliminar todos los restos de los glóbulos rojos y blancos.
- Rocíe regularmente con alcohol las cortinas de la campana de flujo laminar a fin de mantener su esterilidad.
- Antes de la reinyección, asegúrese de filtrar y eliminar los coágulos y otros desechos.
- No deje que los extractores celulares de polipropileno entren en contacto con otros elementos para que mantengan su esterilidad.
- Mantenga todos los elementos tapados dentro de la campana de flujo laminar durante el procedimiento.
- Evite los movimientos de las manos sobre las muestras de tejido, colóquelas junto a la pared trasera de la misma cuando no sea necesario trabajar en ellas.
- Mantenga cerca un depósito de desechos para retirarlos fácilmente.

### 3. LISTA DE MATERIALES

Kit Cellgenic SVF Isolation System– [1 kit por paciente]. Este kit contiene los insumos para la obtención de Plasma Rico en Plaquetas y para el aislamiento de células madre mesenquimales derivadas de la fracción estromal vascular.



El kit contiene los siguientes componentes para el procedimiento:

- [1] Reactivo Celular Colagenasa Cellgenic
- [7] Tubos Cónicos de 50ml
- [2] Jeringas de 60 cc.
- [2] Jeringas de 20 cc
- [1] Jeringa de 3 cc con aguja
- [1] Filtro celular(Cell strainer) para tubo de 50ml
- [1] Filtro para colagenasa 0.22 $\mu$
- [3] Tapones para Jeringas
- [2] Extractores celulares de polipropileno
- [2] Agujas 18g
  
- Otros materiales necesarios NO INCLUIDOS EN EL KIT:
- Guantes
- Gasa estéril 4 x 4
- Botella de Alcohol Clorhexidina o similar
- Plato Plástico o de Acero tipo Riñón
- Rack para acomodar tubos de muestras
- Bolsa de solución salina de 500 cc.
- Vial de Inyeccion intravenosa Regular

#### 4. EQUIPOS DE LABORATORIO BASICOS:



1-Centrifugadora de Rotor Swing Out, con capacidad para acomodar tubos de hasta 50ml.

2-Equipo de photoactivacion celular de LED

3-Cabina de Flujo Laminar con Filtro HEPA

#### Equipos adicionales

Autoclave

Mesa Mayo

Pie o soporte para suero

Monitor de Pulso/Presión arterial/Saturación O<sub>2</sub>

#### 5. PREPARACIÓN DEL ÁREA DE TRABAJO Y DOCUMENTACIÓN.

- Saque de la campana de flujo laminar todos los materiales relacionados con anteriores pacientes y limpie cuidadosamente toda la superficie de la misma con alcohol desinfectante.
- Rocíe con alcohol el rack para colocar los tubos antes de introducirlo en la campana de flujo laminar.
- Tenga a mano el formulario-guía de los pasos del
- Anote el nombre del paciente en los tubos de tapa azul de 50 mL

## 6. LAVADO DE LAS MUESTRAS DE TEJIDO COLECTADAS

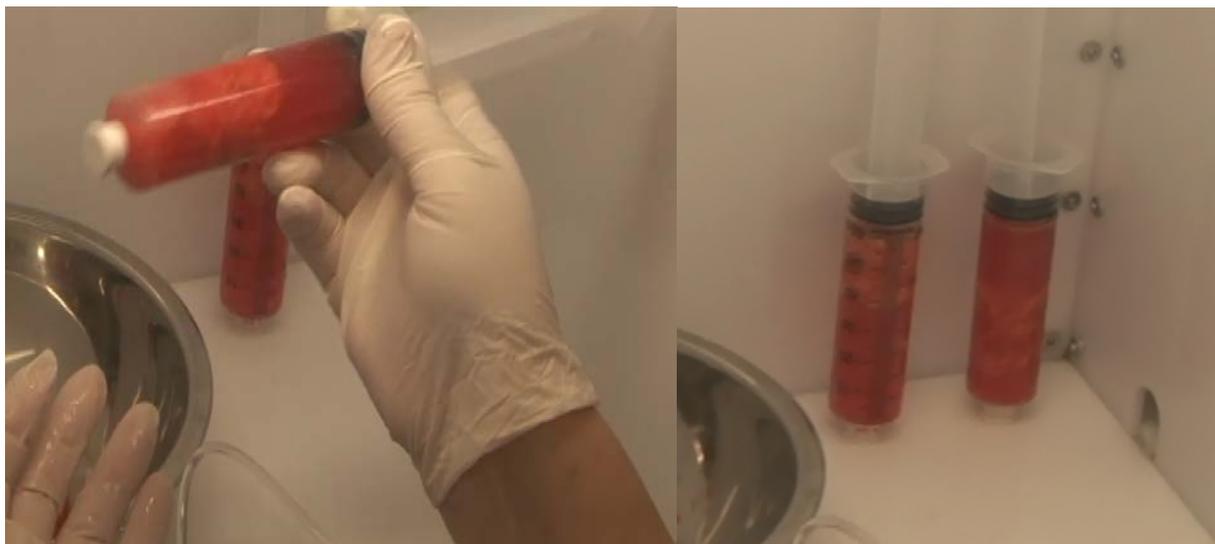
Es indispensable lavar las muestras de tejido colectadas para eliminar la mayoría de los eritrocitos , así como los restos de tumescencia.

Paso 1: Transferir los 60 cc de tejido adiposo colectado previamente a dos jeringas de 60 mL con pico luer lock en partes iguales (30 cc de grasa sólida en cada jeringa).

Paso 2: Añadir solución salina fisiológica a cada jeringa de 60 mL, rellenar hasta el límite, a través de la manguera de la bolsa de suero.



Paso 3: Cerrar con el tapón y agitar suavemente la jeringa sacudiéndola manualmente, colocarla en posición vertical y dejarla reposar. Repetir el mismo proceso con la otra jeringa.



Paso 4: Una vez que se observe decantada la grasa, Desechar la capa infranadante de ambas jeringas sucesivamente para eliminar restos de tumescencia y de sangre cuidando NO DESECHAR PARTES DE LA CAPA DE TEJIDO ADIPOSO.



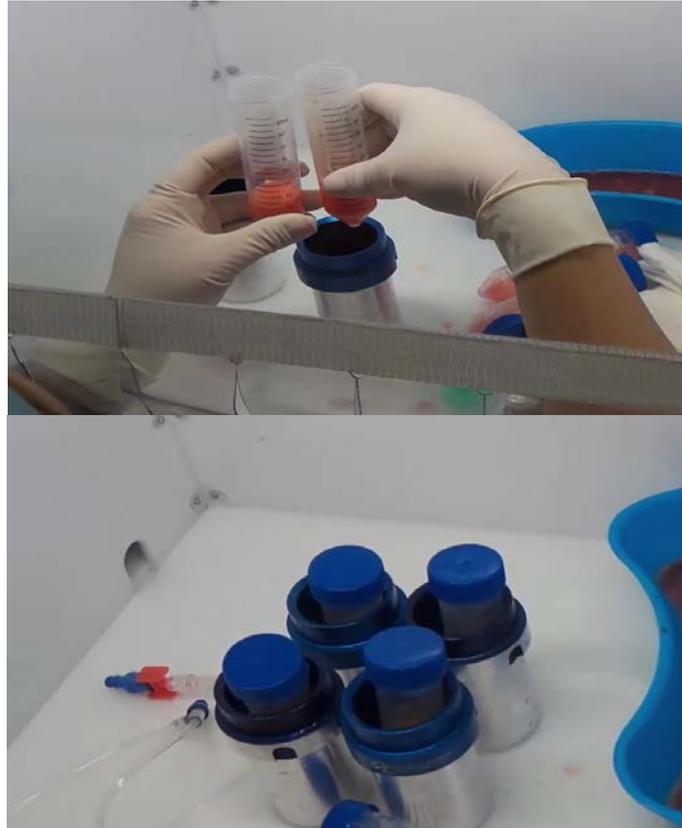
NOTA: Repita tres veces los pasos del **2 al 4**, hasta obtener una muestra limpia de grasa sólida de 30 cc en cada una de las 2 jeringas.

## 7. DIGESTIÓN ENZIMÁTICA

Paso 5: Introduzca en la cabina de flujo laminar 4 tubos cónicos de 50ml, frasco de colagenasa, jeringa de 60ml, aguja de 18G y filtro de 0.22 $\mu$



Paso 6: Transferir el tejido adiposo de la jeringas de 60cc a 4 tubos cónicos de 50ml. A razón de 15ml de grasa previamente lavada en cada uno de los tubos.



Paso 7: Llene la jeringa de 60ml a máxima capacidad con solución salina. Reconstituya la Colagenasa con aproximadamente 5cc de solución, sacuda vigorosamente para disolver y finalmente, aspire todo el contenido para obtener 60ml de colagenasa diluida en solución salina.



Paso 8: Desconecte la aguja y conecte el filtro de 0.22 $\mu$  a la Jeringa de 60cc. Añadir 15 cc de colagenasa diluida a cada uno de los 4 tubos con tejido adiposo.



Paso 9: Agitar vigorosamente los 4 tubos durante 30 segundos ,y déjelos reposar por 5 minutos. Repita esta operación durante un plazo total de 20 minutos.



## 8. CENTRIFUGADO Y FILTRADO

NOTA: La centrifugación de dos etapas se hace para separar las células, cuando se termine de centrifugar la primera vez, se observará un tubo con capas de grasa líquida, restos celulares, solución salina y en el fondo nuestro botón de fracción estromal vascular. La primera centrifugación es para obtener las células del estroma y la segunda es para lavar las mismas.



Paso 10: Colocar los tubos en la centrifuga y ajustar el setting del equipo para 5 minutos a 2400 Rpm.



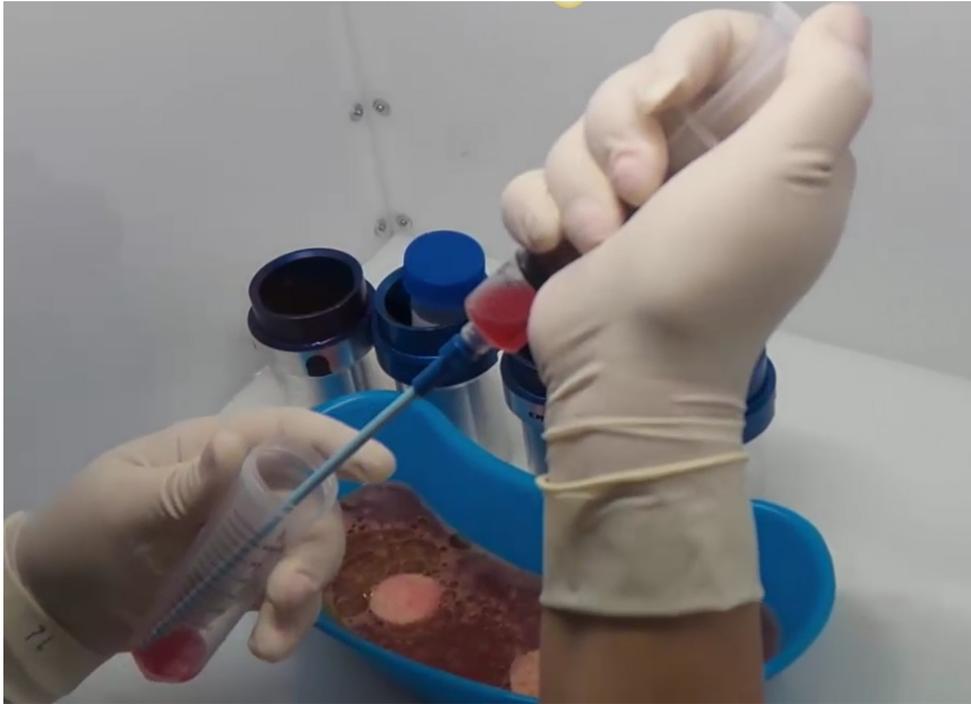
Paso 11: Introduzca en la Campana de Flujo laminar 2 tubos cónicos limpios, una pipeta de polipropileno, una jeringa de 20cc.



Paso 12: Extraer los tubos de la centrífuga y desechar cuidadosamente el exceso de contenido (sobrenadante y solución salina), cuidando mantener los botones (pellet) en el fondo con al menos 5 mL de fluido.



Paso 13: Utilizando una pipeta o extractor de polipropileno conectado a una jeringa de 20cc aspirar y soltar sucesivamente el fluido hasta eliminar la adherencia del botón (pellet) al fondo del 4 tubos cónicos.



Paso 14: Reparta equitativamente la suspensión de células en 2 cónicos de 50ml y rellenos con solución salina hasta la línea de 45 mL. Asegúrese de que queden bien cerrados.



Paso 15: Centrifugue nuevamente los 2 tubos a 2400 RPM, durante 5 minutos.



Paso 16: Extraer los tubos de la centrifuga y desechar el exceso de fluido hasta dejar 5 mL aprox en cada uno de los tubos.



Paso 17: Tomar una jeringa de 20cc y un extractor de polipropileno estéril y repetir (**paso 13**) la operación de extracción del botón de fracción estromal vascular y la eliminación de la adherencia del botón al fondo de ambos tubos cónicos. Logre obtener un total de 10cc en la jeringa.



## 9. SUSPENSIÓN DE LAS CÉLULAS EN PLASMA RICO EN FACTORES DE CRECIMIENTO PLAQUETARIO Y FILTRADO

Paso 18: Proceda a aspirar con la misma jeringa de 20cc el Plasma Rico en factores de crecimiento. Reconstituya las células de fracción estromal vascular obtenida de ambos tubos en plasma rico en factores de crecimiento plaquetario. (Aproximadamente 8 mL). Evite aspirar parte del coágulo retraído que puede haberse formado.



Paso 19: Coloque el filtro en un tubo cónico estéril de 50 mL e inyecte delicadamente las células suspendidas en el plasma rico en factores de crecimiento plaquetario a través del filtro, para que los pequeños coágulos se queden en la malla.



Paso 20: Retire el filtro y aspire nuevamente el contenido ya filtrado en el tubo. Al terminar cubra la aguja con su tapa.



## 10. FOTO-ACTIVACIÓN

Paso 24: Active la mezcla obtenida de células y plasma, introduciéndola en el Photoactivador LED durante un lapso de 10 minutos.



## 11. REINTEGRACIÓN

El producto final obtenido mediante este protocolo es de 30 a 60 millones de células activadas y suspendidas en 18cc de fluido. La reintegración de estas células se realizará por protocolo específico o por decisión facultativa.