

UNIVERSITATEA "OVIDIUS" DIN CONSTANȚA

ȘCOALA DOCTORALĂ DE MEDICINĂ

DOMENIUL DE DOCTORAT: MEDICINĂ

REZUMAT TEZA DE DOCTORAT

**NOI ABORDĂRI ÎN MEDICINA REGENERATIVĂ A ȚESUTURILOR
MOI, BAZATE PE LIPO-TRANSFERUL ASISTAT SAU NU DE
CELULE STEM**

**Conducător de doctorat:
Prof. univ. dr. ION BORDEIANU**

**Student - doctorand:
SORIN – DANIEL NAE**

CONSTANȚA, 2017

Cuprins

I. INTRODUCERE	1
II. SCOP ȘI OBIECTIVE	2
III. ANALIZA LITERATURII	2
III.1. Tesutul adipos alb – “ <i>filler</i> ” în chirurgia plastică a țesuturilor moi	2
III.1.1. Componentele țesutului adipos	3
III.1.2. Celule stem din țesutul adipos	3
III.2. Procedee de augmentare a țesuturilor moi	4
III.2.1. Grefarea grăsimii autologe structurale	4
III.2.2. Utilizarea fracției SVF (<i>Stromal Vascular Fraction</i>) în augmentarea țesuturilor moi	4
III.2.3. Utilizarea PRP (<i>Platelet Rich Plasma</i>) în chirurgia plastică	4
III.2.4. Tratamente combinate FG + PRP în augmentarea țesuturilor moi	5
III.2.5. Utilizarea ADSC (<i>Adipose Derived Stem Cells</i>) în chirurgia plastică	5
III.2.6. Tehnica CAL (<i>Cell-Assisted Lipotransfer</i>) pentru corectarea defectelor de părți moi	6
IV. MATERIALE ȘI METODE	7
IV.1. Izolarea fracției SVF	7
IV.2. Izolarea și multiplicarea celulelor stem adipocitare ADSC <i>in vitro</i>	7
IV.3. Diferențierea adipogenică a celulelor ADSC	8
IV.4. Studiul clinic	8
IV.4.1. Pregătirea operației	8
IV.4.2. Recoltarea grăsimii prin tehnica Coleman	8
IV.4.3. Obținerea grefei de țesut adipos îmbogățită în celule ADSC	9
IV.4.3.1. Prelucrarea grăsimii, după Coleman	9
IV.4.3.2. Obținerea fracției vascular stromale (SVF)	9
IV.4.4. Infiltrarea grefei de țesut adipos îmbogățită în celule ADSC	9
IV.4.5. Monitorizarea post-operatorie	9

V. REZULTATE ȘI DISCUȚII	10
V.1. Frația SVF este îmbogățită în celule stem ADSC, ce pot fi amplificate în cultură și diferențiate în adipocite mature	10
V.2. Utilizarea tehnicii CAL (Cell Assisted Lipotransfer) de grefare a țesutului adipos îmbogățit în celule stem ADSC conduce la rezultate clinice satisfăcătoare	11
V.3. Integrarea datelor studiului actual în datele prezentate în literatura de specialitate adresând eficiența procedurii CAL	12
V.4. Siguranța utilizării tehnicii CAL	14
VI. CONCLUZII ȘI PERSPECTIVE	15
VII. BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ	16

I. INTRODUCERE

Rezecția diferitelor tumori de la nivelul extremității cefalice, cervicale, sânelui, diverse traume, anomalii congenitale, modificări asociate cu îmbătrânirea, precum și multe alte afecțiuni medicale, au ca rezultat deformarea conturului datorită unor pierderi de substanță la nivelul tegumentului și a țesutului adipos subcutanat (Patrick 2000, 2001, 2004; Patel și colab., 2003) [1-4]. Aceste deficite pot avea nu numai efecte estetice și psihologice, dar pot altera și funcția formațiunii anatomice afectate. Chirurgia plastică și reparatorie și-a dezvoltat strategii din ce în ce mai eficiente în rezolvarea acestor defecte, în acord cu dezvoltarea cunoașterii în domeniu.

Transplantul grăsimii autologe este unul dintre tratamentele promițătoare pentru augmentarea țesuturilor moi și întinerirea facială, datorită lipsei unei cicatrici incizionale și complicațiilor asociate cu materialele străine. Cu toate acestea, apar probleme imprevizibile și o rată scăzută de supraviețuire a grefei din cauza necrozei parțiale (Coleman și Saboeiro, 2007; Yoshimura și colab., 2008. a.) [5, 6].

Cercetările din ultimele decenii au demonstrat că cel mai eficace sistem de reparare a organismului îl reprezintă celulele stem. Acestea sunt celule nespecializate, capabile de autoreînnoire prin mitoze succesive, dar care au capacitatea de a se transforma în diferite tipuri celulare prin diferențiere (Niemela și colab., 2008) [7]. Descoperirea celulelor stem adulte a reprezentat un pas deosebit de important în medicina regenerativă deoarece acestea nu ridică mari probleme etice și sunt mai ușor de recoltat decât celulele stem embrionare. Abia în anul 2002, un grup de cercetători de la Universitatea din California, Los Angeles (*Regenerative Bioengineering and Repair Laboratory, Department of Surgery*), condus de Patricia Zuk a descris celulele stem izolate din țesutul adipos (ADSC), ca celule stem multipotente (Zuk și colab., 2002) [8]. De atunci, cercetările asupra celulelor ADSC și aplicațiile lor terapeutice au cunoscut o evoluție explozivă.

Tesutul adipos alb este o sursă ideală de celule stem adulte datorită faptului că este ușor accesibil în cantități mari, utilizând tehnici de liposucție. Tesutul adipos conține celule progenitor adipogenice în *fracția vascular stromală* (SVF) (Van și colab., 1976) [9]. Totuși, Matsumoto și colab., (2006) [10] au arătat că în procedeele de liposucție un număr semnificativ de celule progenitor adipogenice mor, ceea ce explică rata slabă de supraviețuire a acestor preparate și atrofia lipoaspiratelor transplantate, după un timp îndelungat.

Fracția SVF conține un amestec de celule, printre care progenitori adipocitari și celule endoteliale (Riordan și colab. 2009) [11], ceea ce reprezintă un mare avantaj pentru medicina regenerativă. Celulele SVF proaspăt izolate pot induce formarea de noi vase de sânge prin reasamblarea dinamică a celulelor endoteliale, putând fi astfel utilizate în neovascularizarea terapeutică în caz de ischemie. Mai mult, co-transplantarea SVF previne resorbția grefei de țesut adipos într-un model de grefă de țesut celular subcutanat (Koh și colab., 2011) [12].

Celulele din fracția SVF pot fi cultivate, pe parcursul pasajelor, cultura fiind îmbogățită în celule stem derivate din țesutul adipos (ADSC). Zuk și colab., (2001, 2002) [13, 8] au pus în evidență că celulele ADSC sunt celule stem multipotente care pot suferi diferențiere în celule ale țesuturilor adipos, cartilaginose, osos, pericite, miocite, etc., în condiții particulare.

Descoperirea celulelor ADSC a stimulat interesul utilizării lor împreună cu grefa de țesut adipos într-un număr de studii clinice de reconstrucție tisulară, având în vedere și proprietățile lor de stimulare a angiogenezei și de supresie a stării inflamatorii (Locke și colab, 2011) [14]. În majoritatea aplicațiilor, celulele ADSC sunt izolate din țesutul adipos subcutanat prin tehnici minim invazive și cultivate *in vitro* (Murohara și colab, 2009; Zuk, 2010) [15, 16]. Frecvența proliferării celulelor ADSC și timpul de dedublare a populației celulare depinde de procedeul chirurgical, fiind superioare în cazul rezecției și liposucției tumescente comparativ cu liposucția asistată de ultrasunete (De Ugarte și colab., 2003) [17]. Terapia cu celule ADSC este curent utilizată atât în augmentarea mamară, înlocuind implanturile de silicon, cât și în procedurile de întinerire facială.

În cadrul tehnicilor de inginerie tisulară, suspensii de celule ADSC au fost incorporate în structuri scaffold și transplantate pentru a umple defecte de părți moi (Stosich și Mao, 2006) [18]. În aplicațiile practice ale celulelor ADSC, un rol important l-au jucat hidrogelurile biodegradabile injectabile, care permit distribuția omogenă a celulelor în zona cu defect, indiferent de mărime și formă. În aceste hidrogeluri pot fi incluși compuși biologic activi ca: insulina, factori de creștere sau de inducere a adipogenezei precum dexametazona (Tan și colab., 2010) [19].

Matsumoto și colab. (2006) [10] au pus în evidență faptul că transferul celulelor ADSC combinate cu grăsime menține volumul țesutului adipos injectat. Procedul, numit *lipotransfer asistat de celule* (CAL), reprezintă o nouă alternativă în augmentarea părților moi, inclusiv a sânelor (ASAPS, 2007) [20]. În cadrul CAL, din grăsimea recoltată prin aspirație jumătate este utilizată pentru izolarea celulelor ADSC, care se amestecă ulterior cu cealaltă jumătate și se reinjectează.

II. SCOP ȘI OBIECTIVE

Scop: Actualul studiu urmărește investigarea aplicabilității utilizării lipoaspiratului îmbogățit în celule stem adipocitare ca sursă superioară pentru ingineria tisulară în procedee reconstructive, estetice și corecționale.

Pentru realizarea acestui scop, s-a urmărit finalizarea următoarelor obiective:

Obiectiv 1: Izolarea celulelor stem derivate din țesutul adipos (ADSC) din lipoaspirate clinice în cultură și diferențierea lor adipocitară *in vitro*: studiu pilot pentru confirmarea țesutului adipos ca sursă bogată în celule stem adipocitare.

Obiectiv 2: Utilizarea transplantului de grăsime autologă îmbogățit în ADSC în aplicații clinice: tehnica CAL (Cell Assisted Lipotransfer) utilizată în:

- Procedee reconstructive după rezecții oncologice, traume complexe și anomalii congenitale.
- Aplicații estetice de augmentare (sân, obraz, bărbie).
- Tehnici corecționale de reîntinerire (riduri, fese), de corectare a unor deficite de țesut moale.

Obiectiv 3: Evaluarea postoperatorie a stabilității și aspectului grefelor realizate pe o perioadă de 12 luni.

III. ANALIZA LITERATURII

III.1 Tesutul adipos alb – “*filler*” în chirurgia plastică a țesuturilor moi

Tesutul adipos (AT) este un țesut conjunctiv specializat care există sub formă de depozite ce se deosebesc prin expresia genică, distribuție, cantitate, sex, dimensiuni, specii, etc. Macroscopic, există mai multe tipuri de AT, majore (alb și brun) și minore (din măduva osoasă, glandele mamare) (Bjørndal și colab. 2011) [21]. Având în vedere că în teza actuală se vor realiza investigații asupra AT alb, discuțiile ulterioare se vor referi numai la acest tip de țesut.

AT alb nu este bogat vascularizat, dar fiecare adipocit din acest țesut se află în contact cu cel puțin un capilar, ce oferă suficient suport pentru un metabolism activ. Fluxul de sânge prin AT alb variază în funcție de greutatea corporală și starea nutrițională.

III.1.1 Componentele țesutului adipos

Compoziția celulară a AT nu este omogenă. AT adult uman conține circa 50–70% adipocite, ~ 20–40% celule stromal vasculare și 1-30 % macrofage infiltrate.

Adipocitul reprezintă principalul tip celular al țesutului adipos. Deși au un volum variabil, adipocitele mature din AT sunt celule mari, cu diametre de ~ 20–200 μm. Masa AT este determinată de numărul și volumul adipocitelor. Creșterea volumului AT se realizează prin mărirea dimensiunii adipocitelor preexistente (hipertrofie adipoasă) sau/și prin generarea de noi adipocite (hiperplazie).

Fracția vascular stromală SVF reprezintă o populație insuficient caracterizată de celule, dintre care amintim: pericite, fibroblaste, celule ale endoteliului (celule endoteliale și celule ale musculaturii netede vasculare), celule progenitor pentru adipocite și celule endoteliale. Prezența celulelor progenitor pentru adipocite în fracția SVF poate explica marea viteză de *turn-over* a adipocitelor din depozitele de AT de la subiecții adulți. Aproximativ 1/10 din totalul adipocitelor este reînnoit anual prin două procese antagoniste: moartea celulelor “bătrâne” și adipogeneza celulelor “tinere”.

În afara celulelor, AT conține o matrice din țesut conjunctiv (colagen și fibre reticulare), fibre nervoase, noduli limfatici și stroma vasculară. Matricea ECM a AT furnizează suport structural, rezistență tensilă, situsuri de atașare pentru receptori de pe suprafața celulei și reprezintă o sursă de factori de semnalizare ce modulează o serie de procese precum migrarea, proliferarea și diferențierea celulară, angiogeneza, răspunsul imun, etc.

III.1.2. Celule stem din țesutul adipos

Deoarece în organismul adult, celulele progenitor ale adipocitelor au fost evidențiate în fracția SVF a țesutului adipos alb (WAT), celulele SVF au fost considerate preadipocite primare. Cel mai frecvent, fracția SVF se izolează din lipoaspirate, motiv pentru care poartă și numele de lipoaspirat prelucrat PLA (*processed lipoaspirate*), iar celulele componente se numesc celule SVF sau celule PLA (Zuk și colab., 2002) [8].

S-a demonstrat că celulele din fracția SVF pot fi cultivate în condiții speciale, când are loc o purificare a celulelor din mediu cu îmbogățirea culturii în celule care seamănă cu celulele stem mezenchimale (MSC). După 2001 s-a dovedit că țesutul adipos este una dintre cele mai bogate surse în celule MSC (Zuk și colab., 2001) [13]. Comparativ cu măsura osoasă, într-un gram de grăsime există un număr de 500 ori mai mare de celule stem decât în 1 gram de aspirat de măduvă osoasă.

Un pas important în caracterizarea celulelor ADSC a fost stabilirea markerilor de suprafață, antigene CD (*cluster of differentiation*), în special în comparație cu celulele MSC din măduva osoasă și cu celulele SVF din țesut adipos. Imunofenotipul suprafeței celulelor ADSC este similar cu cel al celulelor MSC din măduva osoasă (Pittenger și colab., 1999) [22] și al celulelor derivate din mușchiul scheletic (Young și colab., 1999) [23]. O diferență majoră apare la nivelul glicoproteinei CD34 care nu apare pe suprafața celulelor MSC, dar este prezentă pe celulele ASC umane la începutul pasajelor (Pittenger și colab., 1999) [22].

Culturile de celule umane ADSC la un pasaj ≥ 1 , spre deosebire de celulele SVF proaspăt izolate, prezintă un nivel redus al expresiei de suprafață a antigenelor de histocompatibilitate și nu mai dezvoltă răspunsuri proliferative alospecifice la nivelul celulelor T (Puissant și colab., 2005; McIntosh și colab., 2006) [24, 25]. Așadar celulele ADSC izolate de la donatori sănătoși alogenici, cultivate *in vitro*, pot reprezenta o sursă excepțională de celule stem pentru uz terapeutic, cu risc diminuat de a genera un răspuns imunitar de respingere a grefei.

Țesutul adipos este o sursă ideală de celule stem autologe, deoarece se obțin ușor cu minim discomfort din partea pacientului, conducând la un număr mare de celule prin expansiune în cultură (Zuk și colab., 2001) [13].

III.2. Procedee de augmentare a țesuturilor moi

III.2.1. Grefarea grăsimii autologe structurale

Grefarea grăsimii (fat grafting, FG) autologe este un procedeu utilizat de 120 ani, dar interesul dezvoltării și utilizării lui în chirurgia plastică a crescut considerabil după elaborarea, la începutul anilor 1980, a tehnicii liposucției. Prezentarea în 1985 a *tehnicii transplantării grăsimii autologe* (AFT), în cadrul unei reuniuni a «*California Society of Plastic Surgeons*», ca un procedeu de mărire a sânilor a stârnit multe controverse. Astfel, în 1987 «*American Society of Plastic and Reconstructive Surgeons Ad-Hoc Committee on New Procedures*», a recomandat interzicerea acestui procedeu deoarece majoritatea grăsimii injectate nu supraviețuiește, iar necroza celulelor conduce la formarea cicatricilor și la microcalcifieri care scad sensibilitatea mamografiei, făcând dificilă depistarea unui carcinom mamar. Ulterior s-a recunoscut că în cazul tuturor intervențiilor chirurgicale pe sân există riscul apariției unor noduli și a unor modificări mamografice și că există posibilitatea diferențierii între calcifierile post-operatorii benigne și carcinoame (Coleman 2001; Coleman și Saboeiro, 2007; Smith 2006) [26, 5, 27]. În ultimii ani se constată o revenire a interesului pentru FG (Bucky și Kanchwala, 2007) [28]. Totuși, cunoștințele noastre privind comportamentul grefei de grăsime rămân insuficiente. O înțelegere mai bună a biologiei dezvoltării, a reglării adipogenezei la nivel molecular și a supraviețuirii adipocitelor este critică pentru optimizarea tehnicii de FG.

III.2.2. Utilizarea fracției vascular stromale SVF (*Stromal Vascular Fraction*) în augmentarea țesuturilor moi

Fracția SVF este o populație celulară rezultată în urma manipulării AT prin omogenizare, digestie enzimatică, centrifugare diferențială, liza hematiilor și spălare.

SVF poate fi izolată fie prin excizia în bloc a grăsimii rezultate în urma operațiilor de abdominoplastie sau reducere mamară, fie din aspirate obținute prin liposucție. Majoritatea cercetătorilor separă fracția SVF din lipoaspiratele (LA) rezultate în urma operațiilor de liposucție. Dacă SVF derivă din LA, celulele din SVF poartă numele și de celule PLA (*processed lipoaspirates*).

În ultimii ani, a apărut un număr crescut de publicații privind utilizarea celulelor SVF în repararea leziunilor provocate de radioterapia practică după mastectomie (Rigotti și colab., 2007) [29], în augmentarea mamară (Yoshimura și colab., 2008 b) [30], reconstrucția mamară după mastectomie (Rigotti și colab., 2010) [31], lipoatrofie facială (Yoshimura și colab., 2008 a) [6], etc.

III.2.3. Utilizarea PRP (*Platelet Rich Plasma*) în chirurgia plastică

Vindecarea leziunilor țesuturilor vii este un proces complex, la care participă multe componente celulare și umorale, inclusiv plachetele sangvine (PS). PS sunt formațiuni anucleate din circulația sangvină ce derivă din fragmentarea megakariocitelor (Gobbi și Vitale, 2012) [32].

Preparatele PRP (*Platelet-Rich Plasma*) au fost inițial obținute în unitățile de transfuzie a sângelui și utilizate pentru hemostază în timpul intervențiilor chirurgicale. PRP este o suspensie autologă obținută prin centrifugarea sângelui în care există o concentrație de PS de 4-6 ori mai mare decât cea normală (200 000/μl). În suspensie, aceste PS rămân viabile și teoretic își prezervă capacitatea de a elibera factorii de creștere timp de circa 7 zile (Everts și colab., 2006) [33].

PRP este utilizat în multe domenii clinice ale chirurgiei pentru a stimula vindecarea plăgilor și diminuarea sângerării în timpul operației. PRP este de asemenea utilizată în chirurgia estetică pentru reîntinerirea facială prin stimularea dermului, cu efectele secundare minore.

Tratamentul cu PRP autologe este în general considerat sigur la pacienții selectați în mod corespunzător. Cu toate acestea, utilizarea și validarea clinică a PRP este încă la început. Rezultatele cercetărilor și ale tentativelor preclinice nu au fost confirmate prin testări clinice controlate (Borzini și Mazzucco, 2007) [34].

III.2.4. Tratamente combinate FG + PRP în augmentarea țesuturilor moi

Transferul grăsimii autologe (AFT) este un procedeu care permite grefarea unui "filler" ideal în augmentarea țesuturilor moi. Totuși, în literatura medicală se observă variații mari în ratele de supraviețuire celulară (10-90%). În ultimul timp, câteva grupuri de cercetători au propus co-aplicarea grăsimii recoltată în special prin tehnica Coleman (1995, 1997) [35, 36] și a PRP – un rezervor natural de factori de creștere ce stimulează repararea și regenerarea tisulară. Adăugarea PRP la grăsime poate reprezenta o modalitate de a furniza substanțe nutritive, îmbunătățind supraviețuirea grefei de țesut adipos. Eliberarea factorilor de creștere stimulează angiogeneza, diferențierea și proliferarea celulelor, conducând la reconstituirea unei matrici tridimensionale, care permite plasarea adipocitelor într-o structură 3D.

Având în vedere că timpul de viață al adipocitelor din grefă este scurt, Modarressi (2013) [37] recomandă metoda descrisă de Coleman în care se injectează o cantitate mică de grăsime în straturi fine pentru a crește suprafața accesibilă receptorilor (Coleman, 2001) [26], ce crește șansa la supraviețuire și revascularizare.

Într-o serie de studii *in vitro* s-a demonstrat că PRP crește rata de supraviețuire a celulelor AT și a diferențierii celulelor stem (Natsuko și colab., 2008) [38]. Deși efectul PRP asupra AT a fost studiat *in vitro* și pe animale model, aplicațiile clinice n-au încă suportul unor studii controlate randomizat.

III.2.5. Utilizarea ADSC (Adipose Derived Stem Cells) în chirurgia plastică

Fracția mononucleară a AT, numită SVF, a fost inițial descrisă ca o sursă de precursori adipocitari, activi mitotic, de către Hollenberg și Vost, în 1969 (Rangwala și Lazar, 2000) [39, 40]. Noțiunea de celule stem derivate din țesut adipos (ADSC) a fost recunoscută numai după 2001, când Zuk și colab. au demonstrat că SVF conține un număr mare de celule tip-MSc ce pot suferi diferențiere la adipocite, condrocite, miocite și osteoblaste. Acești autori atrag pentru prima dată atenția că celulele stem din AT reprezintă o opțiune promițătoare pentru strategiile ingineriei tisulare de viitor.

Majoritatea cercetătorilor (Gregoire, 2001; Rosen și MacDougald, 2006; Cawthorn și colab., 2012) [41-43] descriu două faze ale adipogenezei:

Faza 1 – determinarea, care include transformarea celulelor stem mesenchimale (MSC) multipotente în preadipocite;

Faza 2 – diferențierea terminală, care caracterizează transformarea preadipocitului în adipocit, făcându-se deosebirea între ADSC și preadipocite. Principala diferență între cele două tipuri de celule mesenchimale este aceea că ADSC sunt celule stem multipotente și se diferențiază în adipocite, condrocite, miocite și osteoblaste, iar preadipocitele sunt celule unipotente, angajate numai în diferențierea adipogenică (Laudes, 2011) [44].

În prezent este unanim recunoscut că celulele ADSC pot fi ușor extrase din țesutul adipos, sunt capabile de expansiune *in vitro*, au capacitatea de a se diferenția în multiple tipuri

celulare și pot fi utilizate în medicina regenerativă (Yuksel și colab., 2005; Stosich și Mao, 2006; Schäffler și Büchler, 2007; Choi și colab., 2010) [45-48]. Deja au fost publicate studii clinice, dintre care unele au demonstrat succesul tratamentului cu ADSC în reconstrucția tisulară. Totuși există încă probleme legate de dificultățile practice de extindere a protocoalelor de izolare a acestor celule la volume necesare clinic, de faptul că preparatele celulare izolate în diferite laboratoare se deosebesc prin gradul de puritate, markerii moleculari caracteristici, etc (Locke și colab, 2011) [14].

Sunt necesare studii suplimentare pentru a evalua siguranța utilizării lor la om, existând semne de întrebare privind izolarea și purificarea ADSC, efectul lor asupra creșterii tumorale, etc. Sunt în curs de desfășurare studii clinice utilizând terapia cu ADSC, iar rezultatele lor parțiale sunt promițătoare nu numai în chirurgia plastică dar și în alte specialități medicale. Astfel, Herreros și colab. (2012) [49] au realizat un studiu clinic randomizat în mai multe centre, pe 200 pacienți adulți privind implicarea celulelor ADSC autologe în managementul unor fistule anale complexe, ale cărui date parțiale demonstrează faptul că această procedură este sigură și demonstrează urgentarea procesului reepitelizare a rănilor deschise. Este necesară standardizarea protocoalelor și realizarea unor studii randomizate mai mari care asigură siguranța aplicațiilor conform directivelor FDA (*U.S. Food and Drug Administration*) (Gir și colab., 2012) [50].

International Stem Cell Institute din San Diego, care este liderul mondial în terapia cu celule stem consideră că s-a demonstrat că celulele stem adulte reprezintă o reală posibilitate pentru vindecarea unor boli și condiții medicale, fiind o direcție de viitor a medicinei, în comparație cu celulele stem embrionare care au condus la rezultate negative. Ei au anunțat lansarea programului privind terapia cu celule ADSC în tratarea unor maladii și condiții degenerative. Pentru scopuri terapeutice din sângele periferic se pot separa circa 10000 celule stem, din măduva osoasă – 50 000 celule stem, iar din țesut adipos până la 60×10^6 celule ADSC.

III.2.6. Tehnica CAL (*Cell-Assisted Lipotransfer*) pentru corectarea defectelor de părți moi

Pentru a depăși inconvenientele practice ale grefării grăsimii autologe, s-a dezvoltat o nouă strategie numită lipotransfer asistat de celule (CAL – Cell Assisted Lipotransfer), în care au fost utilizate celulele ADSC autologe în combinație cu grefa de țesut adipos.

Mulți autori n-au utilizat celulele ADSC purificate *in vitro* ci fracția SVF proaspăt izolată, care este o populație heterogenă de celule, printre care și ADSC. Procedul este utilizat în special în augmentarea sânilor prin grefarea grăsimii autologe îmbogățită în celule SVF.

În cazul grefării grăsimii autologe, AT implantat supraviețuiește printr-un mecanism de simplă difuzie până este restabilită circulația sangvină. Astfel supraviețuirea grefei, în particular în cazul unui volum mare grefat este rezultatul unui echilibru între acest proces și moartea celulară indusă de hipoxie (Lin și colab., 2008) [51]. Factorii care favorizează supraviețuirea celulară induc retenția pe termen lung și prin urmare, durata de viață a grefei.

SVF favorizează vascularizația neoangiogenică și activitatea fibrinogenică a fibroblastelor ce ameliorează supraviețuirea AT și induce organizarea 3-D. Comparativ cu tehnica FG tradițională, supraviețuirea grefei este mai probabilă și necroza AT este redusă, datorită neovascularizației în zona implantată (Gentile și colab., 2012) [52]. Riordan și colab. (2009) [11] consideră că procedul CAL cu fracția SVF conduce la cele mai bune rezultate în chirurgia plastică deoarece furnizează nu numai celule ADSC care pot fi diferențiate în vederea formării țesutului adipos, dar și alte tipuri celulare care induc angiogeneza și au efecte imuno-modulatoare. În plus, fracția SVF este și o sursă de factori solubili care facilitează procesul de vindecare a rănilor, iar costul procedurii este mai mic decât în cazul utilizării celulelor ADSC.

IV. MATERIALE ȘI METODE

Parte din cercetările care fac obiectul tezei mele de doctorat sunt rezultatul unor vechi colaborări cu Departamentul de Biochimie și Biologie Moleculară de la Universitatea din București și care au fost finanțate prin Proiectul complex de cercetare exploratorie PCCE 248 (2010-2013) intitulat: *"Noi concepte și strategii pentru dezvoltarea cunoașterii unor noi structuri biocompatibile în bioinginerie"*, la care am fost partener.

IV.1. Izolarea fracției SVF

Lipoaspiratele au fost obținute din AT subcutanat al unor pacienți care au suferit liposucție cosmetică. Toate procedurile medicale au fost efectuate cu consimțământul pacienților, în conformitate cu Declarația de la Helsinki și cu aprobarea Comisiei de Etică (decizia nr. 3076/10.06.2010). Din studiu au fost excluși pacienții afectați de neoplazii, infecții, inflamații și boli autoimune.

Toate etapele au fost realizate în condiții de lucru sterile, utilizându-se reactivi și medii sterile. Lipoaspiratele au fost stocate la temperatura camerei (maximum 4 ore) sau la 2 - 8°C (maximum 24 ore) înaintea procesării. Tehnica de procesare a lipoaspiratului a fost optimizată urmărind în principal protocolul descris de Gimble și colab. (2007) [53] și constă în:

- spălarea fracției pentru a îndepărta majoritatea hematiilor și leucocitelor;
- dispersia AT prin digestie cu collagenază și
- centrifugarea digestului când se separă populația adipocitelor mature care plutesc în mediu în timp ce fracția SVF sedimentează.

IV.2 Izolarea și multiplicarea celulelor stem adipocitare ADSC *in vitro*

Procedura utilizată în cadrul Departamentului de Biochimie și Biologie Moleculară de la Universitatea din București este o variantă a metodelor deja publicate în literatura de specialitate (Aust și colab., 2004) [54] privind izolarea celulelor ADSC umane din lipoaspirate, după digestia cu collagenază.

După ultima etapă de centrifugare din cadrul protocolului de obținere a celulelor LA/SVF, sedimentul celular a fost resuspendat într-un mediu DMEM:F12 cu conținut scăzut în glucoză (Sigma-Aldrich) suplimentat cu 40 % ser fetal bovin (FBS), 1 % ABAM, 13.8 mM NaHCO₃ și 0.5 mM piruvat de sodiu. Mediul a fost schimbat la 24 ore până când celulele au atins 70-80% confluență, când au fost detașate și transferate în noi vase de cultură. Pasajele celulare au fost numerotate consecutiv.

Cuantificarea numărului de celule s-a efectuat utilizând hemocitometrul - o metodă clasică de monitorizare a viabilității și proliferării celulelor. Evaluarea viabilității celulare s-a realizat utilizând Trypan Blue - un colorant care pătrunde în interiorul celulelor moarte datorită deteriorării structurii și permeabilității membranei. Celule moarte, colorate în albastru, se deosebesc astfel de cele vii, incolore.

Senescența celulelor izolate din lipoasirat și cultivate pe parcursul a 10 pasaje, a fost evidențiată prin detecția activității enzimei β -galactozidaza (β -Gal) cu kitul Senescence Cells Histochemical Staining (Sigma-Aldrich).

IV.3. Diferențierea adipogenică a celulelor ADSC

Celulele ADSC aflate în pasajul III au fost evaluate din punctul de vedere a diferențierii adipogenice. Inducerea adipogenezei în cazul celulelor ADSC se realizează cu un cocktail hormonal conținând insulină, dexametazonă și 1-metil-3-izobutilxantină (Rosen și Spiegelman, 2000) [55].

Pentru a promova diferențierea adipogenică a celulelor ADSC, acestea au fost crescute în mediul de cultură suplimentat cu 0.5 mM 3-Izo-butil-1-metilxantină (IBMX) (Sigma-Aldrich), 1 μ M dexametazonă (DEX), 1 μ g/ml (2.26 μ M) Triglitzonă, 1 μ M Insulină, 10 μ g/ml (~41 μ M) Biotină, 200 μ M Indometacin, 0.1 mM Hidrocortizon, 0.2 nM 3,3',5 - Tri-iodo-tirozină și 10 μ g/ml Transferină – toți reactivii fiind procurați de la Sigma-Aldrich. Celulele au fost menținute în acest mediu timp de 21 zile.

Procesul de diferențiere adipogenică a fost ulterior monitorizat prin colorația lipidelor cu Oil Red O și prin studii de imunofluorescență.

Pe măsură ce avansează diferențierea adipogenică, are loc acumularea intracitoplasmatică a lipidelor, asociată cu modificările morfologice ale celulelor, până la stadiul de adipocit, care conține circa 90 % din volumul lui lipide. Acumularea lipidelor a fost evidențiată prin microscopie în contrast de fază, în urma colorației cu Oil Red O (Sigma-Aldrich).

Markerii de suprafață specifici celulelor MSC, evidențiați prin microscopie de fluorescență, au fost: CD44, CD73 și CD90. S-a ales ca martor negativ antigenul CD34, specific celulelor stem hematopietice (HSC). Anticoprii primari și secundari utilizați în următorul procedeu au fost produși de compania Santa Cruz Biotechnology, INC.

IV.4. Studiul clinic

IV.4.1. Pregătirea operației

Toți pacienții au fost sfătuiți să renunțe la fumat înainte de intervenția chirurgicală. A fost întreruptă administrarea anumitor medicamente (cum ar fi cele care cresc riscul de sângerare sau de tromboză). Pacienții au fost sfătuiți să nu mai mănânce și să nu mai bea lichide cu minim 6 ore înainte de intervenția chirurgicală. După efectuarea anamnezei, toți pacienții au fost evaluați clinic, în special în ceea ce privește zonele cu depozite adipoase în exces și calitatea tegumentelor (grad de hidratare, elasticitate, infecții locale, etc.).

IV.4.2. Recoltarea grăsimii prin tehnica Coleman

Majoritatea intervențiilor chirurgicale au fost efectuate sub anestezie generală sau epidurală. Cele mai folosite zone donatoare au fost cele recunoscute (Padoin și colab., 2008) [56] ca având cel mai ridicat potențial de obținere a celulelor stem adulte, respectiv abdomenul și fața internă a coapselor (mai ales în treimea superioară). Pe cât posibil, zonele donatoare au fost accesate prin incizii plasate în pliuri, cicatrici anterioare, vergeturi sau zone păroase (Rohrich și colab., 2004) [57]. Toate intervențiile au fost realizate în condiții de maximă sterilitate.

În toate situațiile, pentru a asigura hemostaza, zonele donatoare au fost infiltrate cu un amestec conținând adrenalină 1:1 000 000 (Coleman, 2007) [5]. Am folosit o canulă boantă tip Coleman, de 15 sau 23 cm lungime, cu diamteru de 1 – 2.5 mm, prevăzută cu două orificii plasate foarte aproape de vârf, atașată la o seringă tip Luer, de 10 ml. Cele două orificii distale ale canulei au dimensiuni și formă ce permit recoltarea celor mai mari fragmente intacte de AT care pot trece prin lumenul seringii tip Luer-Lock.

IV.4.3. Obținerea grefei de țesut adipos îmbogățită în celule ADSC

IV.4.3.1. Prelucrarea grăsimii, după Coleman

Jumătate din grăsimea aspirată a fost prelucrată după tehnica propusă de Coleman. Pentru a asigura sterilitatea am utilizat o centrifugă cu un rotor central sterilizabil prevăzut cu lăcașuri în care au fost plasate seringile de 10 ml. Seringile au fost centrifugate la 700 g, timp de 3 minute, componentele separându-se în funcție de densitate. Stratul superior, mai puțin dens, are o componentă uleioasă. Stratul mijlociu este constituit din porțiuni potențial viabile de AT, iar stratul cel mai dens care sedimentează la baza tubului de centrifugă conține sânge, apă și lidocaină. Stratul uleios a fost decantat din seringă cu ajutorul unui tampon absorbant. După schimbarea de 2-3 ori a tamponului, pistonul a fost introdus înapoi în corpul seringii și împins, permițând grăsimii să alunece spre vârful seringii și să oblitereze "spațiul mort".

IV.4.3.2. Obținerea fracției vascular stromale (SVF)

Pentru a izola fracția vascular stromală (SVF) am utilizat protocolul propus de Yoshimura (Yoshimura și colab., 2008.a) [6]. Cealaltă jumătate din țesutul adipos recoltat a fost supusă dispersiei cu collagenază tip I, 0.075%, în tampon fosfat salin și agitare timp de 30 minute la 37°C. Amestecul a fost apoi repartizat în seringi de 10 ml și supus centrifugării timp de 5 minute, la 1200 g. Frația SVF a fost localizată în sedimentul rezultat, situat dedesubtul lipoaspiratului. Am amestecat apoi grăsimea purificată cu fracția vascular stromală (SVF), și am transferat produsul obținut în seringi de 10 ml.

IV.4.4. Infiltrarea grefei de țesut adipos îmbogățită în celule ADSC

Grefele de AT au fost plasate în situsul recipient astfel încât au fost fie separate unele de altele cât mai mult posibil de către țesutul gazdă, ceea ce a creat o suprafață mai mare de contact între grăsimea recoltată și țesuturile recipiente, facilitând astfel difuzia și respirația (Piasecki și colab., 2007) [58].

În etapa de infiltrare am utilizat anestezia locală și/sau generală. Infiltrarea s-a realizat cu o canulă de infiltrare boantă tip Coleman, având un singur orificiu chiar în apropierea vârfului, pentru scăderea riscului apariției echimozelor sau hematoamelor. Utilizarea canulelor boante a permis plasarea grefelor de AT într-o manieră mai stabilă. Am utilizat canule cu vârf ascuțit (care oferă un control mai bun pentru plasarea în plan imediat subdermic, în țesutul fibros și în cicatrici) doar pentru a îndepărta aderențele, dar cu precauții pentru a evita lezarea nervilor și a altor structuri subiacente. La nivelul feței, volumul maxim de țesut plasat la fiecare retragere a canulei a fost de 0.1 ml, iar în unele zone, cum ar fi pleoapele, chiar 0.02 – 0.03 ml.

IV.4.5. Monitorizarea post-operatorie

Pacienții au fost monitorizați la 3, 6 și respectiv 12 luni de la operație.

V. REZULTATE ȘI DISCUȚII

Grăsimea autologă nefracționată este folosită în mod curent în proceduri reconstructive și estetice ca filler pentru repararea defectelor asociate țesuturilor moi. Facilitatea cu care țesutul adipos (AT) poate fi recoltat, injectat, sau versatilitatea sa reprezintă câteva dintre avantajele oferite chirurgului plastician. Din nefericire, adipocitele mature din țesutul transplantat suferă în mod frecvent procese degenerative, astfel încât grefele sunt adesea resorbite parțial sau conduc la dezvoltarea de chisturi și calcifieri locale (Frye și colab., 2005; Stillaert și colab., 2007) [59-60].

Studii recente au evidențiat faptul că țesutul adipos matur conține celule stem pluripotente, numite celule stem adipocitare (ADSC) (Sterodimas și colab., 2010) [61]. Scopul actualei lucrări a constat în evaluarea aplicabilității lipoaspiratului îmbogățit în celule stem adipocitare (ADSC) în procedee reconstructive, estetice și corecționale, ca alternativă superioară actualelor tehnici de inginerie tisulară. Pentru realizarea acestui scop, ne-am concentrat atenția asupra fracției vasculare stromale (SVF), îmbogățită în ADSC.

V.1: Fracția SVF este îmbogățită în celule ADSC, ce pot fi amplificate în cultură și diferențiate în adipocite mature

Celulele ADSC ce pot fi izolate din fracția vascular stromală sunt prezente în număr foarte redus. Conform estimărilor actuale ele reprezintă sub 0.02% din această fracție (Stillaert et al, 2007) [60]. Drept urmare, pentru utilizarea unei populații pure de celule stem preadipocitare în aplicații clinice este necesară întâi o expansiune considerabilă a acestei populații. Cultivarea celulelor ADSC *in vitro/ex-vivo* permite nu numai multiplicarea lor, dar și caracterizarea populației celulare, oferind în același timp posibilitatea diferențierii lor în adipocite mature prin manipularea compoziției mediului de cultură.

Studiul actual a urmărit așadar într-o primă etapă izolarea în culturi celulare aderente a unei populații de celule stem preadipocitare, expansiunea lor, precum și identificarea factorilor biochimici necesari diferențierii lor adipocitare.

Lipoaspirate obținute din AT subcutanat al unor pacienți care au solicitat proceduri cosmetice de liposucție au fost prelucrate conform protocolului descris de Gimble și colab (2007) [53] pentru izolarea fracției SVF. Celulele individuale izolate au fost plasate în vase de cultură și au fost incubate în medii de cultură conținând nutrienți și ser fetal, componente esențiale pentru menținerea viabilității celulelor. (Lodish, 2013; Campisi & d'Adda di Fagagna, 2007) [62, 63].

Senescența celulelor primare izolate din fracția SVF a fost interogată prin efectuarea unei colorații citochimice care permite evidențierea markerului Senescence Associated- β -Galactosidase (SA- β -Gal). Analiza noastră a evidențiat că celulele aflate în pasaje incipiente (I-VII) nu au devenit senescente. Prin urmare, aceste pasaje pot fi utilizate în potențiale tehnici de inginerie tisulară.

Analiza markerilor de suprafață celulară prin tehnici de imunofluorescență a confirmat existența unei populații care exprimă markerii specifici MSC: CD44, CD73 și CD90. Markerul specific celulelor stem hematopoietice CD34 nu a fost detectat, confirmând așadar puritatea populației de celule stem izolate *in vitro*.

În plus, am fost interesați să evaluăm dacă celulele stem izolate în cultura primară pot fi diferențiate în adipocite mature. În acest scop, mediul de cultură a fost suplimentat cu insulină, dexametazonă, glucocorticoizi și 1-metil-3-izobutilxantină (IBMX) (Rosen și Spiegelman, 2000) [55]. În urma suplimentării mediului de cultură cu factorii menținați mai sus, s-a putut observa modificarea treptată a morfologiei celulelor cultivate *in vitro* și acumularea intracitoplasmatică de lipide. Aceste observații confirmă diferențierea celulelor stem în celule adipocitare mature, ce pot fi ulterior folosite în aplicații chirurgicale și de inginerie tisulară.

V.2: Utilizarea tehnicii CAL (Cell Assisted Lipotransfer) de grefare a țesutului adipos îmbogățit în celule ADSC conduce la rezultate clinice satisfăcătoare

Grefarea grăsimii (FG) autologe este un procedeu utilizat de 120 ani, dar interesul dezvoltării și utilizării lui în chirurgia plastică a crescut considerabil după elaborarea, la începutul anilor 1980, a tehnicii liposucției. Principalele probleme raportate în cazul grefării grăsimii autologe sunt: resorbția parțială a grefei, implicând necesitatea repetării procedurii chirurgicale, precum și necroza parțială a țesutului adipos transplantat (Toyserkani și colab., 2016) [64].

Țesutul adipos (AT) implantat supraviețuiește printr-un mecanism de simplă difuzie până este restabilită circulația sangvină. Astfel supraviețuirea grefei, în particular în cazul unui volum mare grefat, este rezultatul unui echilibru între acest proces și moartea celulară indusă de hipoxie (Lin și colab., 2008) [65]. Factorii care favorizează supraviețuirea celulară induc retenția pe termen lung și prin urmare, durata de viață a grefei.

Pentru a depăși inconvenientele practice ale grefării grăsimii prin lipoinjecție, s-a dezvoltat o nouă strategie numită lipotransfer asistat de celule (CAL – Cell Assisted Lipotransfer), în care au fost utilizate celulele ADSC autologe în combinație cu grea de țesut adipos. Mulți autori n-au utilizat celulele ADSC purificate *in vitro*, ci fracția SVF proaspăt izolată, care este o populație heterogenă de celule, îmbogățită în ADSC. (Yoshimura și colab., 2008. a; Matsumoto și colab., 2006) [6, 10].

Riordan și colab. (2009) [11] consideră că procedeul CAL cu fracția SVF conduce la cele mai bune rezultate în chirurgia plastică deoarece conține atât celule ADSC, care pot fi diferențiate în țesut adipos matur, dar și alte tipuri celulare care induc angiogeneza și au efecte imuno-modulatoare. În plus, fracția SVF este și o sursă de factori solubili care facilitează procesul de vindecare a rănilor (Riordan și colab., 2009) [11].

În studiul actual, procedeul CAL a fost aplicat în cazul a 5 pacienți care s-au prezentat cu diferite defecte congenitale sau dobândite ale țesuturilor moi, incluzând: Sindromul Parry-Romberg, lipodistrofie fesieră, sindrom Poland, sau asimetrie mamară. Adicional, 18 pacienți au solicitat procedee estetice – rejuvenarea mâinilor și rejuvenare facială. Utilizarea procedurii CAL a condus la îmbunătățirea semnificativă a aspectului estetic al țesutului moale supus tratamentului. În plus, aspectul obținut în urma procedurii chirurgicale s-a dovedit a fi stabil pentru o perioadă de minim 12 luni.

Studiul actual nu a inclus o cohortă de pacienți atribuiți grupului de control (spre ex. pacienți care să fie tratați prin tehnica FG clasică). Cu toate acestea, rezultatele observate anterior, la pacienți tratați prin lipofilling clasic, au relevat un grad mai mare de resorbție a grăsimii transplantate și calcifieri mai frecvente, rezultatele fiind mai puțin stabile în timp.

În lotul luat în studiu, în toate cazurile, rezultatul final a fost apreciat de către pacienți ca fiind bun sau foarte bun, țesutul transplantat având o consistență moale, naturală. Nu au fost semnalate complicații semnificative, în două cazuri constatându-se necroza parțială a grăsimii transplantate.

În cazul pacienților tratați cu fillere de alta natură (acid hialuronic, collagen, etc.) procedura trebuie repetată în mod periodic, din cauza resorbției materialului de umplere. CAL are avantajul ca țesutul adipos se reface și continuă să prolifereze și deci nu trebuie reinjectat.

V.3: Integrarea datelor studiului actual în datele prezentate în literatura de specialitate adresând eficiența procedurii CAL

Rapoartele publicate în ultimii zece ani nu au atins însă un consens privind superioritatea tehnicii CAL față de tehnica transplantării grăsimii autologe (AFT). În raportul lor retrospectiv, Toyserkani [64] și colaboratorii au concluzionat ca majoritatea procedurilor CAL prezentate în literatura de specialitate par să favorizeze suplimentarea țesutului adipos transplantat cu celule ADSC. Autorii atrag însă atenția asupra faptului că studiile viitoare necesită o mai bună standardizare a modului de raportare, care să permită: (i) o evaluare obiectivă a rezultatelor clinice observate, precum și (ii) identificarea potențialelor riscuri asociate acestei noi proceduri (Toyserkani și colab., 2016) [64].

Este important de amintit că și tehnica AFT a fost întâmpinată cu reticență la momentul introducerii sale. Resorbția și necroza țesutului adipos transplantat reprezintă două dintre complicațiile asociate tehnicii AFT clasice. Se cunoaște faptul că formarea unei vascularizații funcționale guvernează supraviețuirea țesutului adipos matur (Fukumura și colab., 2003) [66]. Prin suplimentarea grăsimii transplantate cu celule ADSC, ce rezidă în țesutul adipos între adipocite sau în ECM (Strawford și colab., 2004) [67], tehnica CAL permite protejarea adipocitelor mature de hipoxie.

Atât fracția vascular stromală (SVF) îmbogățită în celule stem, precum și celulele ADSC izolate din grăsimea autologă pot fi suplimentate țesutului adipos transplantat. Este important de menționat că lipoaspiratele de volum mare (~500 ml) conțin un număr suficient de celule ADSC, astfel încât amplificarea lor *in vitro* nu este necesară (Yoshimura și colab., 2010) [68]. Prin eliminarea etapei intermediare de amplificare a ADSC se evită obiecțiile de natură etică, precum și potențiale complicații imunologice (Toyserkani și colab., 2016) [64], iar în același timp costul și durata procedurii chirurgicale este de asemenea redusă, spre beneficiul pacienților. Din aceste motive, utilizarea fracției SVF este cel mai adesea preferată în procedura CAL.

În prezent, literatura de specialitate oferă atât exemple care susțin superioritatea procedurii CAL comparativ cu tehnica AFT clasică, precum și exemple în care suplimentarea grăsimii transplantate cu celule stem ADSC nu a condus la rezultate semnificativ superioare față de metoda clasică de transplantare.

Toyserkani și colaboratorii (2016) [64] au rezumat observațiile a 7 studii clinice realizate care au comparat tehnica CAL cu procedura AFT clasică. Șase din cele șapte studii analizate au susținut superioritatea tehnicii CAL, deși modul de control, raportare, sau evaluare statistică a studiilor nu este în general satisfăcător (Toyserkani și colab., 2016) [64]. Cinci dintre studiile realizate au optat pentru suplimentarea grăsimii injectate cu fracția SVF; două dintre aceste studii au raportat cazuri de augmentare mamară, în timp ce restul studiilor s-au concentrat asupra procedurilor estetice efectuate la nivelul feței. În majoritatea cazurilor, supraviețuirea grefei de grăsime în urma procedurii CAL a fost superioară celei observate în cazul transplantului AFT clasic, chiar dacă diferența observată a fost modestă (Toyserkani și colab., 2016) [64]. Studiile clinice raportate nu au inclus în general rapoarte histologice ale grefei de grăsime posttransplant. Studii preclinice efectuate pe animale sugerează că în general procedura CAL conduce la formarea unui număr mai redus de chisturi, la maturarea unui număr mai mare de adipocite, precum și la formarea unei vascularizații net superioare, comparativ cu AFT clasic (Toyserkani și colab., 2016) [64].

Sterodimas și colaboratorii (2010; 2011) [61, 69] au comparat de asemenea tehnica CAL cu transplantul clasic de grăsime autologă. Studiul lor din 2011 a urmărit 20 de pacienți suferind de diferite defecte de părți moi la nivel facial (Sterodimas și colab., 2011) [69]. Autorii au concluzionat că pacienților cărora li s-a transplantat grăsime îmbogățită cu ADSC au raportat un grad superior de satisfacție la 6 luni după operație comparativ cu pacienții supuși procedurii clasice. Totuși nivelul de satisfacție la 18 luni de la finalizarea procedurii a fost similar pentru ambele loturi ale studiului efectuat (Sterodimas și colab., 2011) [69]. Autorii au

admis ca procedura CAL este mai scumpă comparativ cu transplantul clasic de grăsime (justificat de necesitatea utilizării de echipament medical și de laborator adițional, precum și de necesitatea angajării personalului specializat adițional), precum și faptul că procedeul de îmbogățire a grăsimii transplantate cu celule stem conduce la prelungirea procedurii chirurgicale. Cu toate acestea, luând în considerare faptul că pacienții supuși procedurii CAL au necesitat un singur transplant pentru obținerea de rezultate estetice mulțumitoare, se poate concluziona că atât costul, cât și timpul final necesar completării operației este în majoritatea cazurilor inferior procedurilor AFT clasice (Sterodimas și colab., 2011) [69]. Deși concluziile autorilor par încurajatoare, datele prezentate nu susțin afirmațiile privind gradul superior de satisfacție al pacienților supuși procedurii CAL la 6 luni de la operație comparativ cu cei supuși procedurii AFT clasice. În plus, autorii au încercat în mod eronat să evalueze din punct de vedere statistic diferențele între gradul de satisfacție ale pacienților supuși celor două proceduri, bazându-și calculele pe gradul subiectiv de evaluare al pacienților. Este bine cunoscut în literatura de specialitate că testele statistice ce evaluează semnificația unui studiu nu se pot baza pe parametri arbitrari, precum autoevaluarea gradului de satisfacție pe o scară arbitrară (Motulsky, 2013) [70]. Evaluarea statistică a volumului de grăsime resorbit sau al procentului de grăsime ce a supraviețuit transplantului prin procedee obiective (RMN, tomografie, ecografie) ar fi reprezentat repere statistice superioare celor raportate în studiul publicat.

Yoshimura și colaboratorii [68] au raportat în 2010 un rezumat al unui set de studii ce au comparat tehnica CAL cu procedeul AFT. Între 2003-2008 autorii au tratat 188 de pacienți, majoritatea (164) fiind supuși procedurilor de augmentare mamară. 26 dintre pacienți au fost supuși procedurii CAL imediat după îndepărtarea protezelor mamare pre-existente. (Yoshimura și colab., 2010) [68]. Un aspect important al acestor studii este reprezentat de faptul că autorii au raportat rezultate obiective, obținute prin tehnici RMN, ecografie, mamografie adițional tehnicilor clasice de video- și fotografie pentru evaluarea pre- și post-chirurgicală. În cazurile de augmentare mamară, măsurătorile 3D realizate la 6 luni de la efectuarea transplantului au indicat că între 40-90% din grăsimea transplantată prin procedura CAL a supraviețuit transplantului. Creșterea finală de volum a variat între 100-250 ml, net sub cea observată în general în procedurile de augmentare ce folosesc implanturi de silicon. Un număr redus de paciente a dezvoltat chisturi cu dimensiuni variind între 5-15 mm (6 paciente), iar 2 paciente au prezentat calcifieri, ce au putut fi distinse ușor de țesutul adiacent. Cu toate acestea, tehnica s-a dovedit superioară din punct de vedere al aspectului final (mai natural) și al consistenței sânelui (Yoshimura și colab., 2010) [68].

Un număr redus de studii clinice au evaluat competența celulelor ADSC purificate și amplificate *in vitro* cotransplantate cu grăsimea autologă. Studii preclinice utilizând modele animale au oferit un prim indiciu că grefarea unui număr mai mare (10^6 - 10^7 comparativ cu 10^5 celule) de celule ADSC purificate conduce la rezultate superioare pe termen scurt, deși diferențele observate între diferitele concentrații celulare devin minime pe termen lung (Toyserkani și colab., 2016) [64].

Cu toate acestea, nu toate studiile clinice au raportat rezultate superioare când tehnica CAL a fost comparată cu lipotransferul clasic. Peltoniemi și colaboratorii au comparat efectele AFT clasice (aplicat în cazul a 8 paciente) cu tehnica CAL (aplicată în cazul a 10 paciente) în contextul augmentării mamare. (Peltoniemi și colab., 2013) [71]. Evaluarea postoperatorie s-a realizat cu ajutorul tehnicii RMN pe o durată de 12 luni, autorii concluzionând că, deși resorbția țesutului adipos după procedura CAL este ușor redusă comparativ cu resorbția post-AFT (50% versus 54%), diferența este minoră și nesemnificativă din punct de vedere statistic (Peltoniemi și colab., 2013) [71]. Cu toate acestea, studiul a utilizat un număr redus de pacienți, făcând dificilă generalizarea rezultatului.

În urma unui studiu comparativ al literaturii de specialitate, Grabin și colaboratorii (2015) [72] afirmă de asemenea că datele actuale nu susțin superioritatea tehnicii CAL, comparativ cu lipotransferul clasic. Autorii atrag atenția că majoritatea rapoartelor clinice utilizează un număr redus de pacienți, raportarea augmentării volumetrice este adesea făcută

În mod subiectiv, iar în plus analiza statistică a datelor prezentate este de multe ori suboptimală. Autorii au recunoscut că în anumite situații evaluarea obiectivă prin tehnica RMN nu este posibilă dacă volumele de grăsime transplantată sunt prea mici pentru a se putea detecta diferențe semnificative. Autorii studiului retrospectiv au insistat așadar asupra necesității realizării unor studii clinice randomizate în modul ,orb' sau ,dublu-orb' pentru a evita subiectivitatea raportării rezultatelor. În plus, este esențial ca studiile clinice viitoare să conțină un număr mai mare de pacienți precum și că perioada de urmărire să fie de lungă durată (Grabin și colab., 2015) [72].

Rezultatele studiului actual par să confirme datele raportate până în prezent în literatura de specialitate. Lipotransferul suplimentat cu fracția SVF a condus la obținerea de rezultate estetice bune și foarte bune, cu o rată scăzută a complicațiilor.

O limitare a studiului actual este absența unui grup de control. Cu toate acestea, comparând rezultatele prezentate cu cele raportate anterior, am putut concluziona că această tehnică (CAL) este o metodă sigură, care duce la rezultate stabile, superioare lipofillingului clasic.

V.4: Siguranța utilizării tehnicii CAL

Ținând cont de faptul că studiile realizate pe modele animale au evidențiat adesea o mai bună vascularizare a grefei de grăsime în cazul suplimentării țesutului adipos cu ADSC (Toyserkani și colab., 2016) [64], se pune așadar întrebarea dacă utilizarea tehnicii CAL în cazul pacienților care au urmat un tratament oncologic poate conduce la activarea unor metastaze latente.

Gentile și colaboratorii (2012) [52] au concluzionat că utilizarea CAL pentru augmentarea mamară în cazul pacientelor care au fost diagnosticate anterior cu carcinom mamar nu a condus la o creștere a numărului de tumori recidivante.

Totuși Perrot și colaboratorii (2010) [73] au raportat un caz de recidivă locală a unui osteosarcom la 18 luni după efectuarea unei operații de lipofiling utilizând tehnica CAL. Pacienta în vârstă de 17 ani nu a prezentat, timp de 13 ani nicio recidivă în urma tratamentului oncologic și chirurgical aplicat pentru îndepărtarea tumorii primare localizate la nivelul brațului. Autorii au realizat un studiu *in vitro* și pe șoareci, urmărind multiplicarea numărului de celule tumorale precum și creșterea volumului tumoral în prezența și absența celulelor ADSC. Co-cultivarea celulelor tumorale cu celule ADSC a condus în primele 24 de ore la o amplificare mai rapidă a celulelor tumorale (Perrot și colab., 2010) [73], deși efectul nu a fost menținut la aceeași intensitate prin prelungirea co-cultivării. Corelația dintre recidiva locală și utilizarea tehnicii CAL în acest studiu de caz pare rezonabilă. Cu toate acestea, concluziile autorilor nu sunt susținute de date experimentale solide. Autorii au încercat să justifice potențialul efect pro-tumorigenic al celulelor ADSC transplantate ca fiind rezultatul amplificării vascularizației locale (Perrot și colab., 2010) [73], deși studiul efectuat nu a evaluat prin nicio metodă dacă tumorile co-transplantate cu celule ADSC sunt într-adevăr mai bine vascularizate comparativ cu cele dezvoltate în grupul de control.

Studiul actual nu a inclus niciun pacient diagnosticat anterior cu cancer și prin urmare nu putem formula o opinie privind efectelor pro- sau anti-tumorigenice ale celulelor ADSC transplantate.

VI. CONCLUZII ȘI PERSPECTIVE

Studiul actual a urmărit evaluarea aplicabilității utilizării celulelor stem adulte adipocitare ADSC în procedee reconstructive, estetice și corecționale.

Într-o primă etapă, am arătat că celulele ADSC pot fi izolate și amplificate în cultură pentru perioade limitate de timp (maxim șapte pasaje) înainte de a intra în senescentță. Celulele stabilizate în cultură au putut fi diferențiate în adipocite mature prin suplimentarea mediului de cultură cu un cocktail conținând: 3-izo-butil-1-metilxantină, dexametazonă, insulină, indometacin și tri-iodo-tirozină. Abilitatea celulelor ADSC de a se diferenția în adipocite mature *in vitro* deschide noi posibilități pentru dezvoltarea a noi abordări de inginerie tisulară.

În paralel, celulele stem ADSC au fost utilizate în 23 proceduri CAL clinice. Am optat în studiul actual pentru utilizarea fracției SVF îmbogățită în celule stem mature, în defavoarea celulelor ADSC amplificate *in vitro*. Această abordare a permis evitarea problemelor de natură etică și a îngăduit finalizarea procedurilor chirurgicale într-un interval redus de timp. Conform cunoștințelor noastre, studiul actual reprezintă primul din România care a evaluat eficiența procedurii CAL în diferite proceduri estetice și reconstructive. Observațiile clinice au îngăduit confirmarea faptului că tehnica CAL este bine tolerată de către pacienți și conduce la rezultate satisfăcătoare atât pentru pacienți cât și pentru medicul curant. În plus tehnica s-a dovedit a fi sigură, nefiind asociată cu complicații semnificative.

Studii viitoare sunt necesare pentru evaluarea cât mai obiectivă a eficienței tehnicii CAL în comparație cu lipotransferul clasic. În principal, studiile viitoare vor trebuie să abordeze o cohortă mai mare de pacienți și să includă un grup de control și vor utiliza (unde este posibil) metode obiective de evaluare pre- și post-chirurgicale, precum RMN, tomografie, ecografie.

Aspecte care se doresc de asemenea a fi urmărite în cercetările ulterioare includ: efectul zonei donatoare și al zonei receptoare asupra procentului de grăsime ce supraviețuiește transplantului: în ce măsură vârsta pacientului afectează reușita procedurii; factorii chimici (chemokine, factori de creștere) care pot fi adăugați pentru a îmbunătăți supraviețuirea găsirii transplantate; numărul / densitatea de celule ADSC transplantate minim necesar pentru a reduce în mod eficient resorbția grăsimii transplantate. În plus, pentru utilizarea tehnicii CAL în cazul pacienților care au urmat tratamente oncologice în trecut, sunt necesare studii care să includă o cohortă mare de pacienți atât în lotul de control, cât și în grupul de tratament, pentru a investiga dacă transplantarea de celule ADSC poate conduce la un risc crescut de recidivă tumorală.

VII. BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. Patrick C. W., Jr.: **Tissue engineering of fat.** *Surg Oncol*, 2000, 19: 302–311.
2. Patrick C. W., Jr.: **Tissue engineering strategies for soft tissue repair.** *Anat Rec* 2001, 263: 361–366.
3. Patrick C. W., Jr.: **Breast tissue engineering.** *Annu Rev Biomed Eng* 2004, 6: 109–130.
4. Patel P. N., Robb G. L., Patrick C. W., Jr.: **Soft tissue restoration using tissue engineering.** *Semin Plast Surg.* 2003, 17: 99–106.
5. Coleman S. R., Saboeiro A. P.: **Fat Grafting to the Breast Revisited: Safety and Efficacy.** *Plast Reconstr Surg*, 2007, 119 (3): 775 – 85.
6. Yoshimura K., Sato K., Aoi N., Kurita M., Inoue K., Suga H., Eto H., Kato H., Hirohi T., Harii K.: **Cell-assisted lipotransfer for facial lipoatrophy: efficacy of clinical use of adipose-derived stem cells.** *Dermatol Surg*, 2008, 34 (9): 1178 - 85. a.
7. Niemelä S., Miettinen S., Sarkanen J. R., Ashammakhi N. A.: **Adipose Tissue and Adipocyte Differentiation: Molecular and Cellular Aspects and Tissue Engineering Applications.** *Topics in Tissue Engineering.* Vol. 4, Eds. N. Ashammakhi, R. Reis, & F. Chiellini © 2008, Chapter 12, p. 1-26.
8. 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.** *Mol Biol Cell.* 2002, 13 (12): 4279–95.
9. Van R. L., Bayliss C. E., Roncari D. A.: **Cytological and enzymological characterization of adult human adipocyte precursors in culture.** *J Clin Invest*, 1976, 58 (3): 699 - 704.
10. Matsumoto D., Sato K., Gonda K., Takaki Y., Shigeura T., Sato T. et al.: **Cell-assisted lipotransfer: supportive use of human adipose-derived cells for soft tissue augmentation with lipoinjection.** *Tissue Eng.* 2006, 12: 3375–82.
11. Riordan N. H., Ichim T. E., Min W. P., Wang H., Solano F., Lara F., Alfaro M., Rodriguez J. P., Harman R. J., Patel A. N., Murphy M. P., Lee R. R., Minev B.: **Non-expanded adipose stromal vascular fraction cell therapy for multiple sclerosis.** *J Transl Med.* 2009, 7: 29.
12. Koh Y. J., Koh B. I., Kim H., Joo H. J., Jin H. K., Jeon J., Choi C., Lee D. H., Chung J. H., Cho C. H., Park W. S., Ryu J. K., Suh J. K., Koh G. Y.: **Stromal vascular fraction from adipose tissue forms profound vascular network through the dynamic reassembly of blood endothelial cells.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2011, 31 (5): 1141 - 50.
13. Zuk P. A., Zhu M., Mizuno H., Huang J., Futrell J. W., Katz A. J., Benhaim P., Lorenz H. P., Hedrick M. H.: **Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies.** *Tissue Eng.* 2001, 7 (2): 211–28.
14. Locke M., Feisst V., Dunbar P. R.: **Concise Review: Human Adipose-Derived Stem Cells (ASC): Separating Promise from Clinical Need.** *Stem Cells*, 2011, 29 (3): 404 - 11.
15. Murohara T., Shintani S., Kondo K.: **Autologous adipose-derived regenerative cells for therapeutic angiogenesis.** *Curr Pharm Des*, 2009, 15 (24): 2784 - 90.
16. Zuk P. A.: **The adipose-derived stem cell: looking back and looking ahead.** *Mol Biol Cell.* 2010, 21 (11): 1783–7.
17. 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* 2003, 174 (3): 101–9.
18. Stosich M. S., Mao J. J.: **Stem cell based soft tissue grafts for plastic and reconstructive surgeries.** *Semin Plast Surg*, 2006, 19: 251 - 60.
19. Tan H., Rubin J. P., Marra K. G.: **Injectable in situ forming biodegradable chitosan-hyaluronic acid based hydrogels for adipose tissue regeneration.** *Organogenesis*, 2010, 6 (3): 173 - 80.
20. American Society for Aesthetic Plastic Surgery (ASAPS), Cosmetic Surgery Quick Facts: 2005 ASAP Statistics. New York, NY; ASAPS. 2006. [Cited 12 January 2007] Available from URL: <http://surgery.org/press/procedurefacts-asqf.php>

21. Bjørndal B., Burri L., Staalesen V., Skorve J., Berge R. K.: **Different Adipose Depots: Their Role in the Development of Metabolic Syndrome and Mitochondrial Response to Hypolipidemic Agents.** *J Obes* 2011; 2011: 490650.
22. 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*. 1999, 284 (5411): 143–7.
23. Young H. E., Steele T. A., Bray R. A., Detmer K., Blake L. W., Lucas P. W., Black A. C. Jr.: **Human pluripotent and progenitor cells display cell surface cluster differentiation markers CD 10, CD 13, CD 56, and MHC class-I.** *Proc Soc Exp Biol Med*. 1999, 221 (1): 63–71.
24. Puissant B., Barreau C., Bourin P., Clavel C., Corre J., Bousquet C., Taureau C., Cousin B., Abbal M., Laharrague P., Penicaud L., Casteilla L., Blancher A.: **Immunomodulatory effect of human adipose tissue-derived adult stem cells: comparison with bone marrow mesenchymal stem cells.** *Br J Haematol*. 2005, 129 (1): 118–29.
25. McIntosh K., Zvonic S., Garrett S., Mitchell J. B., Floyd Z. E., Hammill L., Kloster A., Di Halvorsen Y., Ting J. P., Storms R. W., Goh B., Kilroy G., Wu X., Gimble J. M.: **The immunogenicity of human adipose-derived cells: temporal changes in vitro.** *Stem Cells*. 2006, 24 (5): 1246–53.
26. Coleman S. R.: **Structural fat grafts: the ideal filler?** *Clin Plast Surg*, 2001, 28: 111 - 9.
27. Smith P., Adams W. P. Jr., Lipschitz A. H., Chau B., Sorokin E., Rohrich R. J., Brown S. A.: **Autologous human fat grafting: effect of harvesting and preparation techniques on adipocyte graft survival.** *Plast Reconstr Surg*, 2006, 117 (6): 1836 - 44.
28. Bucky L. P., Kanchwala S. K.: **The role of autologous fat and alternative filler in the aging face.** *Plast Reconstr Surg*, 2007, 120 (Suppl 6): 89S - 97 S.
29. Rigotti G., Marchi A., Galie M., Baroni G., Benati D., Krampera M., Pasini A., Sbarbati A.: **Clinical treatment of radiotherapy tissue damage by lipoaspirate transplant: A healing process mediated by adipose-derived adult stem cells.** *Plast Reconstr Surg*, 2007, 119 (5): 1409 - 22.
30. Yoshimura K., Sato K., Aoi N., Kurita M., Hirohi T., Harii K.: **Cell-assisted lipotransfer for cosmetic breast augmentation: supportive use of adipose-derived stem/stromal cells.** *Aesthetic Plast Surg*, 2008, 32 (1): 48 – 55. b.
31. Rigotti G., Marchi A., Stringhini P., Baroni G., Galie M., Molino A. M., Mercanti A., Micciolo R., Sbarbati A.: **Determining the oncological risk of autologous lipoaspirate grafting for post-mastectomy breast reconstruction.** *Aesthetic Plast Surg*, 2010, 34 (4): 475 - 80.
32. Gobbi G., Vitale M.: **Platelet-rich plasma preparations for biological therapy: Applications and limits.** *Oper Tech Orthop*, 2012, 22: 10 - 5.
33. Everts P. A., Brown Mahoney C., Hoffmann J. J., Schönberger J. P., Box H. A., van Zundert A., Knappe J. T.: **Platelet-rich plasma preparation using three devices: Implications for platelet activation and platelet growth factor release.** *Growth Factors*, 2006, 24 (3): 165 - 71.
34. Borzini P., Mazzucco I.: **Platelet-rich plasma and platelet derivatives for topical therapy. What is true from the biologic view point?** *ISBT Science Series*, 2007, 2: 272-281.
35. Coleman S. R.: **Long-term survival of fat transplants: controlled demonstrations.** *Aesthetic Plast Surg* 1995, 19(5): 421–5.
36. Coleman S. R.: **Facial contouring with lipostructure.** *Clin Plast Surg* 1997, 24: 347 – 67.
37. Modarressi A.: **Platelet Rich Plasma (PRP) Improves Fat Grafting Outcomes.** *World J Plast Surg*, 2013, 2 (1): 6 - 13.
38. Natsuko K, Minakata T, Mitsui T, Kushida S, Notodihardjo FZ, Kusumoto K.: **Proliferation promoting effect of platelet-rich plasma on human adipose-derived stem cells and human dermal fibroblasts.** *Plast Reconstr Surg*, 2008, 122 (5): 1352 - 60.
39. Hollenberg C. H., Vost A.: **Regulation of DNA synthesis in fat cells and stromal elements from rat adipose tissue.** *J Clin Invest* 1969, 47(11): 2485-2498.
40. Rangwala S. M., Lazar M. A.: **Transcriptional control of adipogenesis.** *Annu. Rev Nutr*, 2000, 20: 535 - 59.

41. Gregoire F. M.: **Adipocyte Differentiation: From Fibroblast to Endocrine Cell.** *Exp Biol Med (Maywood)* 2001, 226(11): 997-1002.
42. Rosen E. D., MacDougald O. A.: **Adipocyte differentiation from the inside out.** *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006, 7 (12): 885–96.
43. Cawthorn. W. P., Scheller E. L., MacDougald O. A.: **Adipose tissue stem cells meet preadipocyte commitment: going back to the future.** *J Lipid Res* 2012, 53 (2): 227-46.
44. Laudes M.: **Role of WNT signalling in the determination of human mesenchymal stem cells into preadipocytes.** *J. Mol Endocrinol*, 2011, 46 (2): R65 - 72.
45. Yuksel E., Choo J., Wettergreen M., Liebschner M.: **Challenges in soft tissue engineering.** *Semin Plast Surg*, 2005, 19 (3): 261 - 70.
46. Stosich M. S., Mao J. J.: **Stem cell based soft tissue grafts for plastic and reconstructive surgeries.** *Sem Plast Surg*, 2006, 19: 251 – 60.
47. Schäffler A., Büchler C.: **Concise Review: Adipose Tissue-Derived Stromal Cells — Basic and Clinical Implications for Novel Cell-Based Therapies.** *Stem Cells*, 2007, 25 (4): 818 – 27.
48. Choi J. H., Gimble J. M., Lee K., Marra K. G., Rubin J. P., Yoo J. J., Vunjak-Novakovic G., Kaplan D. L.: **Adipose Tissue Engineering for Soft Tissue Regeneration.** *Tissue Eng Part B Rev* 2010, 16 (4): 413-26.
49. Herreros M. D., Garcia-Arranz M., Guadalajara H., De-La-Quintana P., Garcia-Olmo D.: **Autologous expanded adipose-derived stem cells for the treatment of complex cryptoglandular perianal fistulas: a phase III randomized clinical trial (FATT 1: fistula Advanced Therapy Trial 1) and long-term evaluation.** *Dis Colon Rectum*, 2012, 55 (7): 762 – 72.
50. Gir P., Oni G., Brown S. A., Mojallal A., Rohrich R. J.: **Human adipose stem cells: current clinical applications.** *Plast Reconstr Surg*, 2012, 129 (6): 1277 - 90.
51. Lin K., Matsubara Y., Masuda Y., Togashi K., Ohno T., Tamura T., Toyoshima Y., Sugimachi K., Toyoda M., Marc H., Douglas A.: **Characterization of adipose tissue-derived cells isolated with the Celution system.** *Cytotherapy*, 2008, 10 (4): 417 – 26.
52. Gentile P., Orlandi A., Sciolli M. G., Di Pasquali C., Bocchini I., Curcio C. B., Floris M., Fiaschetti V., Floris R., Cervelli V.: **A Comparative Translational Study: The Combined Use of Enhanced Stromal Vascular Fraction and Platelet-Rich Plasma Improves Fat Grafting Maintenance in Breast Reconstruction.** *Stem Cells Transl Med*, 2012, 1 (4): 341 - 51. C
53. Gimble J.M., Katz A.J., Bunnell B.A.: **Adipose-derived stem cells for regenerative medicine.** *Circ Res*, 2007, 100(9): 1249-1260.
54. Aust L., Devlin B. H., Foster S. J., Halvorsen Y.-D. C., Hicok K., Kloster A. L., du Laney T. V., Sen A., Willingmyre D., and Gimble J. M.: **Recovery of human adipose derived adult stem cells from liposuction aspirates.** *Cytotherapy*, 2004, 6: 1– 8.
55. Rosen E. D., Spiegelman B. M.: **Molecular regulation of adipogenesis.** *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2000, 16: 145 – 71.
56. Padoin A. V., Braga-Silva J., Martins P., Rezende K., Rezende A. R., Grechi B., Gehlen D., Machado D. C.: **Sources of Processed Lipoaspirate Cells: Influence of Donor Site on Cell Concentration.** *Plast Reconstr Surg*, 2008, 122(2): 614-618.
57. Rohrich R. J., Sorokin E. S., Brown S. A.: **In search of improved fat transfer viability: a quantitative analysis of the role of centrifugation and harvest site.** *Plast Reconstr Surg*, 2004, 113 (1): 391 - 5.
58. Piasecki J. H., Gutowski K. A., Lahvis G. P., Moreno K. I.: **An experimental model for improving fat graft viability and purity.** *Plast Reconstr Surg*, 2007, 119 (5): 1571 - 83.
59. Frye C.A., Wu X., Patrick C. W.: **Microvascular endothelial cells sustain preadipocyte viability under hypoxic conditions.** *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 2005, 41(5-6): 160–164.
60. Stillaert F., Findlay M., Palmer J., Idrizi R., Cheang S., Messina A., Abberton K., Morrison W., Thompson E. W.: **Host Rather than Graft Origin of Matrigel-Induced Adipose Tissue in the Murine Tissue-Engineering Chamber.** *Tissue Eng* 2007, 13 (9): 2291 - 300.

61. Sterodimas A., De Faria J., Nicaretta B., Papadopoulos O., Papalambros E., Illouz Y. G.: **Cell-Assisted Lipotransfer**. *Aesthet Surg J*, 2010, 30 (1): 78-82.
62. Lodish H., et al.: *Molecular Cell Biology*, 2013, W. H. Freeman and Company, New York.
63. Campisi J., d'Adda di Fagagna F.: **Cellular senescence: when bad things happen to good cells**. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007 Sep, 8 (9): 729-40.
64. Toyserkani N. M., Jensen C. H., Sheikh S. P., Sorensen J. A.: **Cell-Assisted Lipotransfer Using Autologous Adipose-Derived Stromal Cells for Alleviation of Breast Cancer-Related Lymphedema**. *Stem Cells Transl Med*, 2016, 5(7): 857-9.
65. Lin K., Matsubara Y., Masuda Y., Togashi K., Ohno T., Tamura T., Toyoshima Y., Sugimachi K., Toyoda M., Marc H., Douglas A.: **Characterization of adipose tissue-derived cells isolated with the Celution system**. *Cytotherapy*, 2008, 10 (4): 417 – 26.
66. Fukumura D., Ushiyama A., Duda D. G., Xu L., Tam J. et al.: **Paracrine regulation of angiogenesis and adipocyte differentiation during in vivo adipogenesis**. *Circ Res* 2003, 93(9): e88–e97.
67. Strawford A., Antelo F., Christiansen M., Hellerstein M. K.: **Adipose tissue triglyceride turnover, de novo lipogenesis, and cell proliferation in humans measured with 2H2O**. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2004, 286 (4): E577 – 88.
68. Yoshimura K., Asano Y., Aoi, N., Kurita M., Oshima Y., Sato K., Inoue K., Suga H., Eto H., Kato H., Harii K.: **Progenitor-enriched adipose tissue transplantation as rescue for breast implant complications**. *Breast J*, 2010, 16 (2): 169 - 75.
69. Sterodimas A., De Faria J., Nicaretta B., Boriani F.: **Autologous Fat Transplantation Versus Adipose-Derived Stem Cell-Enriched Lipografts: A Study**. *Aesthet Surg J*, 2011, 31 (6): 682-93.
70. Motulsky H.: **Intuitive Biostatistics: A Nonmathematical Guide to Numerical Thinking**, 2013, Third edition. Oxford University Press.
71. Peltoniemi H. H., Salmi A., Miettinen S, et al.: **Stem cell enrichment does not warrant a higher graft survival in lipofilling of the breast: A prospective comparative study**. *J Plast Reconstr Aesthet Surg S*, 2013, 66: 1494–503.
72. Grabin S., Antes G., Stark G. B., Motschall E., Buroh S., Lampert F. M.: **Cell-assisted lipotransfer - a critical appraisal of the evidence**. *Dtsch Arztebl Int*, 2015 112 (15): 255 – 261.
73. Perrot P., Rousseau J., Bouffaut A-L., et al.: **Safety concern between autologous fat graft mesenchymal stem cell and osteosarcoma recurrence**. *PLos ONE*, 2010, 5 (6): e10999.

Abrevieri

ADSC	Adipose derived stem cells
AFG	Autologous fat grafting
AFT	Autologous fat transfer
AT	Adipose tissue
BSA	Albumină serică bovină
CAL	Cell-Assisted Lipotransfer
cAMP	Cyclic adenosine monophosphate
CD	Cluster of differentiation
CREB	cAMP response element-binding protein
ECM	Extracellular matrix
FBS	Ser fetal bovin
FDA	U.S. Food and Drug Administration
FG	Fat grafting
hADSC	Human Adipose derived stem cells
HSC	Hematopoietic stem cells
HIF-1	Hipoxia inducible factor
IBMX	Izobutil metil xantina
IGF	Insulin-like growth factor
LA	Lipoaspirate
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
MSC	Mesenchymal stem cells
MSH	Melanocyte-stimulating-hormone
PAI-1	Plasminogen activator inhibitor-1
PBS	Tampon fosfat salin
PKA	Protein kinase A
PLA	Processed lipoaspirate
PPARγ	Peroxisome proliferator-activated receptor- γ
PRP	Platelet-rich plasma
RBP4	Retinol binding protein 4
SAT	Abdominal subcutaneous adipose tissue
SA-β-Gal	Senescence Associated- β -Galactosidase
ST	Soft tissue
STA	Soft tissue augmentation

SVF	Stromal vascular fraction
TE	Tissue Engineering
TNFα	Tumor necrosis factor alpha
tPA	Tissue plasminogen activator
WAT	White adipose tissue