

FABIANA ZANATA

**CRIOPRESERVAÇÃO DE TECIDO ADIPOSEO
HUMANO: CARACTERIZAÇÃO DE FRAÇÃO
ESTROMAL VASCULAR, CÉLULAS-TRONCO
DERIVADAS DE TECIDO ADIPOSEO E
ENXERTO DE GORDURA.**

Tese apresentada à Universidade Federal de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências.

SÃO PAULO

2017

FABIANA ZANATA

**CRIOPRESERVAÇÃO DE TECIDO ADIPOSEO
HUMANO: CARACTERIZAÇÃO DE FRAÇÃO
ESTROMAL VASCULAR, CÉLULAS-TRONCO
DERIVADAS DE TECIDO ADIPOSEO E
ENXERTO DE GORDURA.**

Tese apresentada à Universidade Federal de São Paulo,
para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Orientador: Prof^a. Dr^a. Lydia Masako Ferreira

Coorientador: Prof. Dr. Jeffrey Gimble

SÃO PAULO

2017

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Prof. Antonio Rubino de Azevedo,
Campus São Paulo da Universidade Federal de São Paulo, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Zanata, Fabiana

Criopreservação de tecido adiposo humano: caracterização de fração estromal vascular/células-tronco derivada de tecido adiposo e enxerto de gordura / Fabiana Zanata. - São Paulo, 2017.

xvi, 125f.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de São Paulo, Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Translacional.

Título em inglês: Cryopreserved human adipose tissue as a source of precursor stem/stromal cells.

1. Tecido adiposo. 2. Células-tronco adultas. 3. Células estromais. 4. Citometria de fluxo. 5. Criopreservação.



**UNIVERSIDADE FEDERAL
DE SÃO PAULO**



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA
TRANSLACIONAL**

Coordenador: Prof. Dr. Miguel Sabino Neto

ORIENTADOR: Prof^a. Dr^a. Lydia Masako Ferreira

COORIENTADOR: Prof. Dr. Jeffrey Gimble

2017

DEDICATÓRIA

À minha amada mãe,

ROSELI.

Ao meu saudoso pai,

JOSÉ PEDRO.

Ao meu generoso e companheiro esposo,

TOMÁS.

À minha filha, razão de minha vida,

SOPHIA.

AGRADECIMENTOS

À Professora Doutora **LYDIA MASAKO FERREIRA**, Professora Titular da Disciplina de Cirurgia Plástica da Escola Paulista de Medicina – Unifesp, Coordenadora Medicina III da Capes, Pesquisadora CNPq 1A e Coordenadora do Laboratório de Cultura de Células, pela oportunidade única de realizar este estudo, sob sua brilhante tutoria, dentro do Programa de Pós-graduação em Cirurgia Translacional e por fazer parte, como aluna, do Programa de Doutorado no País com Estágio no Exterior pela Capes. Sua incansável busca de rigor e seriedade científica, orientações e incentivos foram e sempre serão fundamentais neste percurso.

Ao Professor Doutor **MIGUEL SABINO NETO**, Professor Livre Docente da Disciplina de Cirurgia Plástica da Escola Paulista de Medicina – Unifesp, Coordenador do Programa de Pós-graduação em Cirurgia Translacional da Escola Paulista de Medicina – Unifesp, pela imensa oportunidade de crescimento pessoal, intelectual e profissional.

Ao Professor Doutor **FABIO XERFAN NAHAS**, Professor Livre Docente da Disciplina de Cirurgia Plástica da Escola Paulista de Medicina – Unifesp, Coordenador do Setor de Reconstrução de Parede Abdominal da Disciplina, pela amizade, generosidade, apoio e ensinamentos desde minha formação, mas principalmente após meu retorno ao Brasil.

Ao Professor Doutor **JEFFREY GIMBLE**, Investigador Sênior e Adjunto do Centro de Pesquisa com Células-tronco e Medicina Regenerativa da Tulane University, pelo treinamento e orientações científicas para a realização deste trabalho. Sua generosidade, orientação

minuciosa e constante no planejamento, execução e revisão deste estudo foram responsáveis por transformar positivamente minha forma de enfrentar novos desafios.

Ao Professor Doutor **BRUCE BUNNELL**, Chefe do Centro de Pesquisa com Células-tronco e Medicina Regenerativa da Tulane University, por me receber como *research fellow* em seu Serviço, pela oportunidade de realizar parte desta tese no Centro de Pesquisa com Células-tronco e Medicina Regenerativa da Tulane University, vivenciando a rotina do seu Laboratório, interagindo e cooperando com seus estudantes.

À Professora Doutora **TRIVIA FRAZIER**, Assistente do Departamento de Engenharia Biomédica da Dillard's University, pela orientação na interpretação dos resultados e revisão do trabalho. Pelo exemplo, de grande pesquisadora com amplos conhecimentos, humildade e talento para o ensino.

À **ANNIE BOWLES**, aluna de Doutorado do Centro de Pesquisa com Células-tronco e Medicina Regenerativa da Tulane University, pela amizade, treinamento nos experimentos e auxílio nas análises de resultados.

Ao Professor **ANTONIO CARLOS ALOISE**, Professor Afiliado do Departamento de Cirurgia da Escola Paulista de Medicina – Unifesp, Doutor em Ciências pelo Programa de Pós-graduação em Cirurgia Plástica da Escola Paulista de Medicina – Unifesp, pelo acolhimento, ensinamentos, responsabilidade e excelência que tanto contribuíram para meu crescimento como pesquisadora.

Aos colegas do Laboratório de Cultura de Células da Disciplina de Cirurgia Plástica da Escola Paulista de Medicina – Unifesp, **ANDRÉ LUIS PIRES**, **MARCELO MELO**, **MATEUS ABREU**, **MARCO MATTAR** (*in memoriam*), **FABIO SHEMANN MIGUEL**, **DELAINE MIGUEL** e **ROSANA YAMAMOTO** pela colaboração e apoio.

Às minhas amigas **ANDREA FERNANDES DE OLIVEIRA**, Doutora em Ciências pelo Programa de Pós-graduação em Cirurgia Translacional da Escola Paulista de Medicina – Unifesp e **MARIA JOSE DE BRITTO**, Doutora em Ciências pelo Programa de Pós-graduação em Cirurgia Translacional da Escola Paulista de Medicina – Unifesp, pelo contributo, companheirismo e, principalmente, pelo carinho e amizade demonstrados desde meu retorno à Unifesp, durante meu desempenho como pós-graduanda, até a culminação deste ciclo.

A todos os demais Docentes da Disciplina de Cirurgia Plástica da Escola Paulista de Medicina – Unifesp, pelos ensinamentos e apoio desde a minha Residência em Cirurgia Plástica.

À **SANDRA DA SILVA**, **MARTA REIS** e **SILVANA APARECIDA ASSIS**, secretárias da Disciplina de Cirurgia Plástica da Escola Paulista de Medicina – Unifesp, pela atenção, suporte e incentivo, sempre que se fizeram necessários.

À **CLAIRE LAMAS**, secretária do Centro de Pesquisa com Células-tronco e Medicina Regenerativa da Tulane University, por me ter recebido no laboratório, pela amizade e suporte administrativo.

À **ANDREIA DO CARMO**, bibliotecária da Bireme, pela ajuda na revisão dos descritores e ficha catalográfica, tão importantes na elaboração de uma Literatura pertinente e lógica.

Aos colegas do Centro Médico Docente La Trinidad, Caracas, Venezuela, em particular ao Dr. **RAFAEL CASANOVA**, pela incrível experiência de 10 anos de trabalho conjunto e impulso a buscar excelência na atenção aos nossos pacientes além de crescimento profissional. Saudades.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), através do Programa de Pós-graduação em Cirurgia Translacional

(Capes nota 6) e pelo suporte financeiro com Bolsa de Doutorado-sanduíche com Estágio no Exterior (carta de concessão Processo BEX 1524/15-1).

“Valeu a pena? Tudo vale a pena
Se a alma não é pequena.
Quem quer passar além do Bojador
Tem que passar além da dor.
Deus ao mar o perigo e o abismo deu,
Mas nele é que espelhou o céu.”

Fernando Pessoa (1888-1935), *Mensagem*

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	II
AGRADECIMENTOS	III
SUMÁRIO	VIII
LISTA DE FIGURAS.....	IX
LISTA DE QUADROS.....	X
LISTA DE TABELAS	XI
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	XII
RESUMO.....	XV
<i>ABSTRACT</i>	XVI
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVO	7
3 LITERATURA	9
4 MÉTODOS	22
5 RESULTADOS	46
6 DISCUSSÃO	60
7 CONCLUSÃO	74
8 REFERÊNCIAS.....	76
NORMAS ADOTADAS	98
APÊNDICES	100
PUBLICAÇÕES DA TESE.....	124
FONTES CONSULTADAS	125

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fotografias representativas do aspecto macroscópico dos EG TAF à esquerda e EG TAC à direita após remoção.....	40
Figura 2 – Tecido adiposo do camundongo com coloração com H&E, MT, perilipina e PVF para controle de normalidade e controle positivo para perilipina e PVF.....	44
Figura 3 – Diferenciação adipogênica das CTTAH TAF e TAC. Análise histoquímica através de coloração com Oil Red O.....	53
Figura 4 – Diferenciação osteogênica das CTTAH TAF e TAC. Análise histoquímica através de coloração com vermelho de alizarina.....	54
Figura 5 – Fotografia representativa do aspecto macroscópico do enxerto de gordura, nove semanas após transplante de um animal do Grupo I.....	56
Figura 6 – Fotomicrografia representativa da microscopia confocal do fragmento de EG de TAF e TAC.....	56
Figura 7 – Histologia – Coloração com H&E (fotos superiores) e TM (fotos inferiores) de EG TAF (lado esquerdo) e EG TAC (lado direito)....	57
Figura 8 – Imuno-histoquímica com coloração para perilipina.....	58
Figura 9 – Imuno-histoquímica com coloração para PVF.....	58
Figura 10 – Fotomicrografia representativa de imuno-histoquímica com coloração para CD31.....	59

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Anticorpos marcadores de superfície para imunofenotipagem por citometria de fluxo das células da FEV	32
Quadro 2 – Anticorpos marcadores de superfície para imunofenotipagem por citometria de fluxo para CTTAH.....	36
Quadro 3 – Lista de genes relacionados à adipogênese e osteogênese utilizados para rt-PCR das amostras de CTTAH TAF e CTTAH TAC induzidas ou não induzidas à diferenciação.....	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Caracterização demográfica da amostra	24
Tabela 2 – Produção celular a partir do processamento de TAH (TAF e TAC)	47
Tabela 3 – Viabilidade celular para os três grupos celulares da FEV (FEV TAF, FEV C e FEV TAC)	48
Tabela 4 – Porcentagens de UFC-F para os três grupos celulares: FEV TAF, FEV C e FEV TAC	48
Tabela 5 – Perfil imunofenotípico de FEV TAF, FEV C e FEV TAC.....	49
Tabela 6 – Coexpressão de marcadores de superfície detectados por citometria de fluxo	50
Tabela 7 – Porcentagens de UFC-F para os dois grupos celulares: CTTAH TAF e CTTAH TAC.....	52
Tabela 8 – Perfil imunofenotípico das CTTAH TAF e CATAH TAC	52
Tabela 9 – Diferenciação adipogênica das CTTAH TAF e TAC – rt-PCR.....	54
Tabela 10 – Diferenciação osteogênica das CTTAH TAF e TAC – rt-PCR	54

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ACP	Agente de criopreservação
<i>Ad libitum</i>	à vontade
AdipoQ	Gene adiponectina
ALPL	Gene fosfatase alcalina
ASB	Albumina sérica bovina
BD	Becton-Dickinson
Ca 2+	Íon cálcio
Capes	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CD	<i>Cluster of differentiation</i> / antígeno marcador de superfície celular
CEBPa	Gene <i>enhancer binding protein alpha</i>
cDNA	DNA complementar
CO₂	Dióxido de carbono
CTM	Células-tronco mesenquimais
CTMO	Células-tronco de medula óssea
CTTAH	Células-tronco derivadas de tecido adiposo humano
CyCB	Gene controle <i>cyclophilina B</i>
DMEM	Meio de cultura Eagle modificado por Dulbecco
DMEM/F12	Meio de cultura Eagle modificado por Dulbecco/Mistura de nutrientes F-12 de Ham
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ECD	Fluorocromo ECD
EG	Enxerto de gordura
EtOH	Etanol
FEV	Fração estromal vascular
FEV C	Fração estromal vascular criopreservada

FITC	Fluorocromo isotiocinato de fluoresceína
G	Força da gravidade
G3PD	Glicerol fosfato desidrogenase
HES	<i>Hydroxiethylstarch</i> (hidroxieltilamido)
H&E	Coloração de hematoxilina e eosina
IBMX	Isobutilmetilxantina
IgG	Imunoglobulina
IRB	<i>Institutional Review Board</i> / Comitê de Ética Local
Micro-CT	Microtomografia computadorizada
MTT	<i>3-(4,5-dimethyl-2-thiazoly)-2,5-diphenyl-2H tetrazolium bromide</i>
O₂	Oxigênio
OA/EB	<i>Orange acridine/Ethidium bromide</i>
OCN	Gene osteocalcina
OPN	Gene osteopontina
PE	Flourocromo ficoeritrina
PCy7	Fluorocromo PCy7
PPARγ	Gene <i>peroxisome proliferator activated receptor gamma</i>
PVF	Proteína verde fluorescente
PVP	Polivinilpirrolidona
RNA	Ácido ribonucleico
Rt-PCR	<i>Real time polimerase chain reaction</i> / Reação de cadeia de polimerase tempo real
RunX2	Gene <i>run related transcription factor 2</i>
SST	Solução salina tamponada
SFB	Soro fetal bovino
TAC	Tecido adiposo criopreservado
TAF	Tecido adiposo fresco
TAH	Tecido adiposo humano
TBS	Solução salina tritamponada

TBS-T	Solução salina tritamponada com polissorbato
TM	Coloração de tricrômio de Masson
UFC-F	Unidade formadora de colônia – Fibroblasto
XTT	<i>2H-tetrazolium-5-carboxanilde</i> usado no ensaio de MTT
°C	Grau Celsius
%	Porcentagem
µg	Micrograma
µM	Micromolar
M	Molar
µm	Micrômetro
µl	Micro litro
ml	Mililitro
®	Marca registrada

RESUMO

Introdução: Tecido adiposo é importante fonte de células-tronco mesenquimais, denotando um aspecto funcional, além do estrutural. A criopreservação é uma opção para a utilização de tecido armazenado, evitando efeitos adversos de coleta, facilitando a utilização imediata ou repetida. **Objetivo:** Analisar a criopreservação do tecido adiposo humano com caracterização de fração estromal vascular/células-tronco derivadas de tecido adiposo e enxerto de gordura. **Métodos:** Tecido adiposo de oito doadores foi processado por digestão enzimática, fresco ou após criopreservação com DMSO por quatro semanas. Fração estromal vascular de tecido fresco, células criopreservadas e células de tecido criopreservado foram caracterizadas por produção, viabilidade, proliferação e expansão em cultura, diferenciação e imunofenotipagem. Enxertos de tecido adiposo fresco e criopreservado em camundongos C57BL/6GFP foram analisados nove semanas após transferência no subcutâneo de camundongos por meio de histologia e imuno-histoquímica. **Resultados:** A criopreservação de tecido adiposo manteve rendimento e viabilidade celular, capacidade de diferenciação adipogênica e osteogênica, aumento da expressão dos marcadores celulares estromais e adipogênicos e redução dos marcadores hematopoiéticos. Enxertos de gordura mostraram aspectos morfológicos e estruturais semelhantes por quantificação de infiltrado celular (H&E) e de fibrose (tricroômio de Masson), presença de células positivas para PVF em áreas periféricas, adipócitos funcionais evidenciados por perilipina e positividade para CD31 evidenciando vascularização, sugerindo um comportamento de suporte estrutural do tecido enxertado no receptor imunocompetente, tanto para tecido fresco como criopreservado. **Conclusões:** O tecido adiposo humano criopreservado mantém rendimento, e viabilidade celular, aumenta marcadores celulares de superfície precursores estromais de células da FEV, mantém características das CTTAH *in vitro* e do enxerto de gordura *in vivo*.

ABSTRACT

Background: Adipose tissue is not only a structural and volume tissue but also brings a functional important role as a source of Adipose-Derived Stromal/Stem Cells. Cryopreservation can avoid the morbidity associated with repetitive liposuction, allowing the use of stored tissue after the initial harvest procedure avoiding the adverse effects that can be a limiting factor for immediate use. This paper focuses on the characterization of fresh and cryopreserved human adipose tissue. This paper focuses on the characterization of fresh and cryopreserved human adipose tissue with the stromal vascular fraction/adipose-derived stem cell characterization and fat graft. **Methods:** Lipoaspirates from 8 donors were processed (collagenase digested) as fresh or cryopreserved tissue in DMSO for 4 weeks. SVF from fresh and cryopreserved tissue and cryopreserved SVF were characterized (cell yield, viability, CFU-F, cell culture, differentiation potential and immunophenotype). Fresh and cryopreserved adipose fat grafting was performed in C57BL/6 GFP mice to analyze morphology using confocal microscopy, histology and immunohistochemistry nine weeks after transplantation. **Results:** Cryopreservation of adipose tissue maintained cell yield, viability and differentiation potential, and also showed reduction in the hematopoietic surface markers and increased expression of stromal and adipogenic cell surface markers. *In vivo* cryopreserved fat grafts have reduced weight, although both groups showed preservation of morphological aspects (cellular infiltration and fibrosis), positive GFP cells in the peripheral areas, perilipin positive viable adipocytes and vascularization (CD31 positive). **Conclusion:** Cryopreserved adipose tissue maintained cell yield, reduces viability, reduces expression of hematopoietic and increased stromal and adipogenic cell surface markers, maintained ASC function and morphology of fat grafts *in vivo*.

1 INTRODUÇÃO

A lipoaspiração é um dos procedimentos de cirurgia plástica mais realizados no Brasil e nos EUA, sendo responsável por mais de 400.000 cirurgias eletivas anuais, de acordo com a The American Society for Aesthetic Plastic Surgery – ASAPS (COSMETIC SURGERY NATIONAL DATA BANK STATISTICS, 2016). Os cirurgiões plásticos sempre estiveram envolvidos no tratamento e reconstrução de lesões, sequelas de traumas ou doenças e, como consequência dos avanços técnicos recentes, o tecido adiposo humano (TAH) lipoaspirado tem sido usado como um recurso potencial para diferentes indicações de enxerto de gordura (COLEMAN, 2001; THOLPADY *et al.*, 2006). Um número crescente de pacientes tem optado por enxerto de gordura como alternativa aos implantes em cirurgias de contorno corporal, como aumento de mamas, região glútea e rejuvenescimento facial (COLEMAN, 2002; 2006a; COLEMAN & SABOEIRO, 2007; CHOI *et al.*, 2013; PU, YOSHIMURA, COLEMAN, 2015). Apesar do crescente uso, essa aplicação clínica ainda é limitada pela taxa de reabsorção variável, requerendo intervenções repetidas para obter a retenção de volume desejado (COLEMAN, 2006b). Além disso, pacientes têm questionado a possibilidade de armazenamento de tecidos para possível uso futuro através da medicina regenerativa (JENKINS *et al.*, 2003). A repetição do procedimento de coleta de TAH por lipoaspiração pode causar desconforto, dor e aumento da morbidade aos pacientes, o que acarreta a limitação do seu uso (PU, 2009; CHAPUT, *et al.*, 2014).

O potencial uso do TAH lipoaspirado para medicina regenerativa advém da descrição da presença de células no corpo humano adulto que

mantêm certo grau de multipotencialidade, que foram identificadas como células-tronco mesenquimais (CTM) e contribuem para a regeneração de seus respectivos tecidos (ZUK *et al.*, 2002). Ainda que outros tecidos possuam estas células, duas importantes fontes de CTM adultas são a medula óssea e tecido adiposo (FRIEDENSTEIN, 1976; OWEN, 1988; OWEN & FRIEDENSTEIN, 1988; CAPLAN, 1991; DENNIS *et al.*, 1992; HAYNESWORTH, BABER, CAPLAN, 1992; ZUK *et al.*, 2001; ZUK *et al.*, 2002). A utilidade dessas células é determinada pela acessibilidade, segmentação, facilidade de coleta, capacidade de expansão, manutenção em cultura e capacidade de contribuir para a regeneração do tecido após a implantação (GIMBLE & GUILAK, 2003b).

As células-tronco derivadas de tecido adiposo (CTTAH) foram isoladas a partir de tecido subcutâneo e têm características semelhantes às de medula óssea, porém tornaram-se mais atraentes para a terapia celular, uma vez que grande número de células pode ser isolado por meio de procedimentos menos invasivos, quando comparados a uma punção de medula óssea, com fácil acesso, obtenção e manipulação, bem como sua capacidade de se diferenciar em tecidos de origem mesodérmica (multipotencialidade), tais como osso, cartilagem e gordura, denotando uma vasta gama de possível futura pesquisa translacional (FRIEDENSTEIN *et al.*, 1968; ZUK *et al.*, 2001; ZUK *et al.*, 2002; HORWITZ *et al.*, 2005; DOMINICI *et al.*, 2006; NAUTA, GURTNER, LONGAKER, 2013).

Fração estromal vascular (FEV) é a população heterogênea de células isoladas a partir do processamento do tecido adiposo por meio de digestão enzimática ou mecânica e resulta em $2,5 \times 10^5$ a $3,75 \times 10^5$ células por mililitro de tecido processado (YU *et al.*, 2010). FEV inclui células do sistema imunológico, pericitos, fibroblastos, células endoteliais e células

estromais precursoras (THIRUMALA, GIMBLE, DEVIREDDY, 2010a; ZIMMERLIN *et al.*, 2010; PACHÓN-PEÑA *et al.*, 2011; MCINTOSH *et al.*, 2013). Antes de expansão em cultura para a proliferação de CTTAH, portanto com menor manipulação, a FEV tem gerado grande interesse. Recentemente foi demonstrado aumento da capacidade anti-inflamatória *in vitro* das células da FEV quando em comparação com as células expandidas em cultura (THIRUMALA, GIMBLE, DEVIREDDY, 2010a; PACHÓN-PEÑA *et al.*, 2011; BOURIN *et al.*, 2013; SHAH *et al.*, 2013).

A cultura de células da FEV leva a uma população de células aderentes denominadas CTTAH, uma população mais homogênea, que apresenta antígenos de superfície comuns com outras células mesenquimais (GRONTHOS *et al.*, 2001; PACHÓN-PEÑA *et al.*, 2011). A caracterização das CTTAH, com análise de sua capacidade de diferenciação foi bem descrita por vários autores (ZUK *et al.*, 2001; ZUK *et al.*, 2002; GIMBLE & GUILAK, 2003a; MITCHELL *et al.*, 2006; BUNNELL *et al.*, 2008; YU *et al.*, 2010; GAIBA *et al.*, 2012; BOURIN *et al.*, 2013; SHAH *et al.*, 2013). Muitos estudos têm se concentrado no potencial de autorrenovação e diferenciação em vários tecidos especializados para que, em futuro próximo, possam ser testados e utilizados clinicamente (TAKAHASHI & YAMANAKA, 2006; TAKAHASHI *et al.*, 2007; EAVES, HAECK, ROHRICH, 2012; D'AMICO *et al.*, 2013). Além da ampla capacidade de diferenciação *in vitro* das CTTAH, elas têm a vantagem de relativa abundância, facilidade de isolamento e expansão *in vitro*, além de excluïrem aspectos éticos, dada sua origem em tecido adulto (BUEHRER & CHEATHAM, 2013).

Alguns modelos animais de doenças humanas e de estudos pré-clínicos demonstraram que tanto FEV e CTTAH secretam citocinas e fatores de crescimento que parecem favorecer a capacidade de regeneração

e podem desempenhar um papel na imunidade inata (COUSIN *et al.*, 2003; GIMBLE & GUILAK, 2003b; WEISBERG *et al.*, 2003; XU *et al.*, 2003; NEELS, THINNES, LOSKUTOFF, 2004; REHMAN *et al.*, 2004; NAKAGAMI *et al.*, 2005; MOON *et al.*, 2006; KIM *et al.*, 2007; GIMBLE *et al.*, 2008; KANG *et al.*, 2008; KIM *et al.*, 2008; CASPAR-BAUGUIL *et al.*, 2009; GONZALEZ *et al.*, 2009; GIMBLE, GUILAK, BUNNELL, 2010; HAN *et al.*, 2010; POGGIO *et al.*, 2010; YANG *et al.*, 2010; ETO *et al.*, 2011; GIMBLE *et al.*, 2011).

Torna-se claro que TAH não é apenas um órgão estrutural, mas também funcional, envolvido no metabolismo e sinalização em níveis locais e sistêmicos (THOLPADY *et al.*, 2006; GIMBLE *et al.*, 2013) de grande interesse para a medicina regenerativa e a engenharia de tecidos (JENKINS *et al.*, 2003).

A criopreservação é um meio que permite a disponibilização de produtos de forma imediata, facilitando as pesquisas e até uso clínico (JANG *et al.*, 2017). Essas técnicas de criopreservação modernas têm permitido o armazenamento por longo prazo de células e tecidos para uso clínico de forma imediata, tais como transfusão de sangue, transplante de medula óssea, fertilização *in vitro*, enxertos vasculares, enxertos ósseos e enxertos de pele (PEGG, 2002).

A criopreservação de CTTAH em nitrogênio líquido para fins de investigação ou clínicos mantém o imunofenótipo celular, capacidade proliferativa e de diferenciação (THIRUMALA *et al.*, 2010; YONG *et al.*, 2015), ainda que alguns autores reportam redução da capacidade de diferenciação (JAMES *et al.*, 2011). Essa característica ainda não está bem clara para a FEV (ZIMMERLIN *et al.*, 2010; ZIMMERLIN *et al.*, 2013). Por esse motivo, estudos recentes envolvendo a criopreservação de células e tecidos enfatizam a caracterização das células por meio de rendimento e

viabilidade celular, análise imuno-histoquímica, citometria de fluxo, expressão gênica por meio de reação de cadeia de polimerase em tempo real (rt-PCR) –, para avaliar o padrão de certas mudanças gênicas em relação à expressão em células ou tecidos frescos (BOGDANOVA *et al.*, 2014; CHOUDHERY *et al.*, 2014; DAVIES *et al.*, 2014).

Considerando que a criopreservação de tecido adiposo representa uma abordagem alternativa que contorna a necessidade de coleta de tecido autólogo no momento e local de atendimento, alguns grupos demonstraram resultados com estudos de um conjunto limitado de parâmetros pós-descongelamento de acordo com diretrizes de métodos de rigor científico para sua adequada caracterização (CUI & PU, 2009; 2010). Ainda faltam estudos que analisem a viabilidade e funcionalidade do tecido adiposo pós-descongelamento *in vitro* ou *in vivo* por períodos de criopreservação mais longos.

2 OBJETIVO

2. Objetivo

Analisar a criopreservação do tecido adiposo humano por meio da caracterização da fração estromal vascular, células-tronco derivadas de tecido adiposo e enxerto de gordura.

3 LITERATURA

SHOSHANI *et al.* (2001) reportaram o primeiro estudo de criopreservação de tecido adiposo humano (TAH), coletando tecido por meio de lipoaspiração de doador único. O tecido foi centrifugado a 1.500 rpm durante cinco minutos e então congelado diretamente, sem a utilização de agente de criopreservação (ACP) a -18°C por duas semanas. O tecido foi descongelado em temperatura ambiente por uma hora. O modelo *in vivo* usado foi a injeção de um ml de enxerto de gordura (EG) com agulha 14-gauge em calvária de camundongos *nude*. Os 20 animais foram divididos em dois grupos, sendo que o grupo controle recebeu tecido fresco (dez animais), e o segundo grupo, tecido criopreservado. Os enxertos foram removidos após 15 semanas. Foi reportada a persistência do EG e não houve diferença de peso ou histologia pela avaliação qualitativa da coloração com hematoxilina e eosina (H&E).

MACRAE *et al.* (2004) testaram a viabilidade de amostras de tecido adiposo, após armazenamento sem ACP por oito dias, a 37°C , -20°C e -196°C . Nesse estudo a viabilidade foi medida pela atividade metabólica mitocondrial (MTT) com leitura em espectrofotômetro que evidenciou redução significativa em temperaturas mais baixas, de 75% para preservação a -20°C e 85% a -196°C , comparado ao armazenamento a 37°C .

PU *et al.* (2004) iniciaram uma sequência de estudos testando DMSO e trealose como ACP. O TAH foi obtido através de lipoaspiração de região abdominal de oito doadores, centrifugado a 50 G por dez minutos; a camada intermediária foi criopreservada, excluindo a camada oleosa superior e o líquido inferior. O tecido foi dividido em três grupos: tecido adiposo fresco; tecido adiposo criopreservado sem ACP; e tecido adiposo criopreservado com solução contendo DMSO 0,5M (3,3%) e trealose 0,2M (7,6%). As amostras criopreservadas foram mantidas em temperatura ambiente por dez minutos antes de serem congeladas lentamente, a 1 ou 2°C por minuto, de 22 a -30°C, e depois transferidas para nitrogênio líquido (-196°C). O descongelamento foi realizado após 20 minutos, em temperatura ambiente por dois minutos e, após isso, a 37°C, em banho-maria. A avaliação foi realizada apenas por estudos *in vitro*: contagem celular em hemocítômetro através de coloração com azul de Tripán, ensaio de espectrofotometria com glicerol-3-fosfato desidrogenase (G3PD) para avaliação da função celular (leitura em espectrofotômetro específica para tecido adiposo, pois trata-se de uma enzima intracelular e, quando presente na solução de uma amostra, reflete a proporção de dano celular) e coloração com H&E para análise histológica (alteração estrutural, degeneração dos adipócitos ou necrose). Neste trabalho, encontraram viabilidade de 73% após criopreservação com DMSO e trealose como ACP. O grupo sem ACP teve menos de 50% de viabilidade, função celular melhor mantida com ACP após 20 minutos de criopreservação e ausência de degeneração ou necrose na histologia. É preciso enfatizar que 20 minutos foram considerados como um longo período de criopreservação.

WOLTER *et al.* (2005) usaram tecido adiposo obtido por diferentes técnicas (redução mamária, abdominoplastia e lipoaspiração) de 24 doadores. Viabilidade celular foi testada em 14 amostras após dois dias de criopreservação a -20°C sem ACP. Cinco amostras foram usadas para testar diferentes combinações de ACP (hidroxietilamido HES 10%, glicerol 10%, dextran 5%) e temperaturas (-20°C e -80°C) para criopreservar o tecido adiposo por dois dias. Os ensaios *in vitro* utilizados para avaliação foram MTT e G3PD e mostraram redução de até 78% na viabilidade detectada pelo MTT, com 84% de atividade de G3PD no tecido criopreservado sem ACP e que o ACP melhorou a viabilidade e integridade celular e não houve diferença entre as temperaturas estudadas.

MOSCATELLO *et al.* (2005) estudaram tecido lipoaspirado com técnica tumescente de quadris, coxas, abdômen e braços de 20 doadores. Quatro grupos foram analisados: tecido criopreservado sem ACP a -20°C; DMSO 10%; polivinilpirrolidona 7,5% mais DMSO 5%; glicerol 10%. Exceto pelo grupo sem ACP, as demais amostras foram criopreservadas após resfriamento lento controlado, a 1°C por minuto em freezer a -80°C, e transferidas para tanque de nitrogênio líquido, onde foram mantidas por quatro meses. As amostras descongeladas em banho-maria foram submetidas a digestão enzimática com solução de colagenase tipo I por 30 minutos. As células da FEV obtidas foram avaliadas com ensaio de fluorescência e mostraram diminuição da viabilidade, sendo que DMSO apresentou melhor resultado, com 65,9% de viabilidade. A capacidade de proliferação das amostras preservadas sem ACP não cresceram em cultura,

enquanto que as que foram preservadas com ACP mantiveram sua capacidade de aderência e multiplicação.

PU *et al.* (2005) testaram trealose 7,6% como ACP para a criopreservação de lipoaspirado de 12 doadores com protocolo de processamento, criopreservação e descongelamento e realizaram os mesmos testes de viabilidade *in vitro* do trabalho anterior (PU *et al.*, 2004), ensaio de espectrofotometria com G3PD e H&E, também considerando 20 minutos equivalente a criopreservação por longo período, concluindo que trealose mantém viabilidade estrutural do tecido criopreservado.

PU *et al.* (2006a) testaram novamente a associação de DMSO 3,3% e trealose 7,6% para a criopreservação de lipoaspirado de 12 doadores com protocolo de processamento, criopreservação e descongelamento descrito no trabalho de 2004 (PU *et al.*, 2004). A cultura das células de tecido adiposo fresco e criopreservado por 20 minutos foi avaliada por meio de contagem celular, após 15 dias em cultura, não se observando diferença entre os grupos.

PU *et al.* (2006b), complementaram os estudos anteriores (PU *et al.*, 2005; PU *et al.*, 2006a) testando a qualidade do tecido criopreservado *in vivo* em modelo animal com camundongos *nude*. O tecido adiposo foi obtido por lipoaspiração de doador único, lavado em solução salina tamponada (SST) e centrifugado. A camada mais inferior com mais adipócitos viáveis foi separada e dividida em três grupos: tecido adiposo

fresco (controle positivo); tecido adiposo criopreservado com ACP (DMSO e trealose 5%); tecido adiposo criopreservado sem ACP (controle negativo). O mesmo protocolo dos dois trabalhos anteriores foi utilizado, com resfriamento lento controlado de 22°C a -30°C e transferência para tanque de nitrogênio líquido por 20 minutos de criopreservação, descongelados em temperatura ambiente por dois minutos e banho-maria a 37°C para finalização, quando o tecido foi lavado para remoção do ACP. Os enxertos de um ml foram injetados sob pele da calvária em 20 animais para cada grupo, coletados após 16 semanas, para avaliação de peso e histologia (H&E). Os enxertos sofreram absorção de quase 50% para o grupo controle positivo e de 70% para o grupo de tecido criopreservado com ACP. O grupo criopreservado sem ACP apresentou peso próximo a 5% do peso injetado. A histologia com H&E mostrou discreta cápsula fibrosa, poucas áreas de fibrose semelhantes entre tecido fresco e criopreservado com ACP.

ATIK *et al.* (2006) utilizaram tecido adiposo de camundongos albinos, comparando tecido fresco e criopreservado através imersão em glicerol ou nitrogênio líquido. Após seis meses, o tecido foi descongelado em temperatura ambiente por uma hora. O teste de MTT demonstrou manutenção da viabilidade das células da FEV do tecido criopreservado em nitrogênio líquido por volta de 66,4% comparado com 78,3% do tecido fresco. As células do tecido imerso em glicerol tiveram viabilidade inferior (38,1%). Enxertos sob pele da calvária dos camundongos (enxertos autólogos) foram removidos após seis meses e histologia com coloração para H&E mostrou que a preservação em nitrogênio líquido por seis meses manteve morfologia similar ao tecido fresco por quantificação de

proporção de tecido adiposo intacto. Este foi o único estudo que não encontrou diferenças sem uso de ACP.

CUI *et al.* (2007) publicaram um estudo combinando análise *in vitro* e *in vivo* da criopreservação de tecido adiposo de lipoaspirado obtido de 36 doadores dividido em três grupos: tecido adiposo fresco; tecido adiposo criopreservado por 20 minutos sem ACP; tecido adiposo criopreservado por 20 minutos com DMSO 3,3% e trealose 7,6% como ACP. Diferentes métodos de resfriamento foram utilizados, entretanto o resfriamento lento e controlado a 1°C por minuto de 22 a -30°C e posterior transferência a -196°C demonstrou melhor manutenção da viabilidade das células após processamento e contagem das células viáveis obtidas de tecido fresco e criopreservado com ACP. Estudo *in vivo* foi realizado em modelo animal com camundongos *nude* mostrando maior peso e a histologia mostrou melhor preservação da arquitetura dos enxertos de tecido criopreservado com ACP em relação ao grupo sem ACP.

CUI *et al.*, (2009) usaram mesmo protocolo de obtenção e processamento do tecido adiposo de estudos de PU *et al.* (2004). Neste estudo foram utilizados lipoaspirados de oito doadores e testadas diferentes concentrações de trealose como ACP, avaliando através dos mesmos testes do trabalho de 2004 (contagem ou produção celular, G3PD e histologia com H&E). Trealose a 7,6% preservou a viabilidade sem diferença em relação ao grupo controle de tecido fresco. O ensaio de G3PD não mostrou

diferença entre os grupos. A histologia analisou qualitativamente o aspecto do tecido também sem diferenças entre os grupos.

CUI & PU (2010) repetiram os testes *in vivo* do modelo animal descrito pelo mesmo grupo em 2006 (PU *et al.*, 2006b), usando lipoaspirado de único doador em 20 camundongos *nude* obtendo resultados semelhantes de manutenção de volume e aspecto do tecido enxertado comparável entre tecido fresco e criopreservado.

LI *et al.* (2012) usaram lipoaspirado de 10 doadores e testaram diferentes temperaturas (-20°C, -80°C e -196°C) com HES 10% como ACP e solução salina como controle. O ensaio de MTT demonstrou redução da viabilidade celular do tecido criopreservado após dois dias e ainda mais intensa após sete dias, principalmente no grupo preservado em solução salina, mas também no grupo em que utilizaram o HES como ACP. A temperatura não afetou a viabilidade. Seis áreas de enxertos de 0,1 ml em dorso de camundongos *nude* foram injetadas após quatro semanas de criopreservação. Os fragmentos foram coletados após 12 semanas e estudos histológicos (H&E) não evidenciaram diferenças entre os grupos.

WANG *et al.* (2013) utilizaram DMSO 10% como ACP por 30 dias à temperatura de -80°C e demonstraram, através de citometria de fluxo (ensaios de anexina para apoptose e necrose), ensaios de proliferação e diferenciação, que ACP protege CTTAH de apoptose.

CHOUDHERY *et al.* (2014) compararam tecido adiposo fresco e criopreservado de dez doadores, por meio de ensaios *in vitro*. O tecido foi criopreservado por uma semana em criotubo de 5 ml e DMSO 20% foi usado como ACP. Marcador imunofenotípico das CTTAH (CD34, CD44, CD45, CD73, CD90); potencial de proliferação e de diferenciação (rt-PCR com lipase lipoproteica e PPAR γ); histoquímica com coloração para *Oil Red O* e nitrato de prata). Perfil imunofenotípico das CTTAH não foi alterado com criopreservação de tecido; potencial de proliferação e capacidade de diferenciação não sofreram alterações significativas com a criopreservação, em relação às células obtidas de tecido fresco.

ALMEIDA *et al.* (2014), utilizando tecido adiposo de 27 ratos *Wistar*, reportaram criopreservação com DMSO como ACP mantido por sete dias a -196°C em comparação com criopreservação sem ACP. Os criotubos foram transferidos diretamente para nitrogênio líquido, sem serem submetidos a redução controlada de temperatura. As amostras foram descongeladas em temperatura ambiente de forma lenta, sem uso de banho-maria. Neste estudo, citometria de fluxo e quantificação de DNA para análise de integridade celular foram usadas para caracterização pós-criopreservação. Os autores propuseram criopreservação sem uso de DMSO, pela identificação de dano ao DNA, independentemente do processo de criopreservação.

CHAPUT *et al.* (2014) analisaram a criopreservação de tecido adiposo de 30 doadores com DMSO 2,5 ou 5%, albumina humana e HES, em bolsas de 50 ml com resfriamento lento controlado e mantidos a -20°C , -80°C e -196°C por uma semana para as análises *in vitro* e quatro semanas

para os experimentos *in vivo*. A análise *in vitro* foi realizada por meio de unidade formadora de colônia-fibroblasto (UFC-F), cultura celular, análise fenotípica com marcadores celulares de superfície para FEV (CD45, CD14, CD 13, CD31, CD90, CD34, viabilidade celular 7-amino actinomicina D). Enxertos de gordura *in vivo* em duas colunas, em região dorsal de 30 camundongos *nude* com um ml de volume, mantidos por seis semanas, foram avaliados segundo peso e histologia (H&E e tricrômio de Masson). Não houve diferença na viabilidade da FEV, o peso dos enxertos de TAC se reduziu a menos da metade do tecido fresco e a histologia mostrou maior infiltrado inflamatório e fibrose no TAC.

BAE *et al.* (2015) usaram CTTAH e FEV para incrementar a viabilidade e retenção de volume do tecido adiposo criopreservado a -20°C por duas semanas (não houve detalhamento do método de criopreservação). Uma alíquota de lipoaspirado de único doador foi processada por digestão enzimática com collagenase tipo I para obtenção de fração estromal vascular (FEV) e as células cultivadas em meio específico para obtenção de CTTAH. A viabilidade celular foi calculada com ensaio de azul de tripan e as células foram criopreservadas em DMSO 10% por oito semanas a -20°C. As células foram caracterizadas por imunofenotipagem com marcadores e ensaios de diferenciação adipogênica e osteogênica (PPAR γ , C/EBP α , osteopontina e osteocalcina). Tecido adiposo foi criopreservado por oito semanas a -20°C. Enxertos de gordura de 0,4 ml em dorso de 30 camundongos *nude* divididos em três grupos: 0,4 ml de tecido adiposo criopreservado com 0,02 ml de FEV (obtida de 0,4 ml de tecido adiposo mas não especificado o número de células viáveis na suspensão); 0,4 ml de tecido adiposo criopreservado com 0,02 ml de CTTAH (também não especificado o número de células da suspensão); grupo controle com 0,4 ml

de tecido adiposo criopreservado com 0,02 ml de solução salina. Neste estudo não foi utilizado tecido fresco como controle. A caracterização dos enxertos após oito semanas de implantação incluiu peso, volume, histologia com H&E e imuno-histoquímica com CD31. A análise imonofenotípica foi positiva para CD44, CD73, CD90 e CD 105, e negativa para CD31 e CD45 caracterizando células mesenquimais. Os ensaios de diferenciação demonstraram capacidade de diferenciação pelo incremento da expressão dos genes analisados relacionados a adipogênese e osteogênese. CTTAH aumentaram peso e volume dos tecidos enxertados, melhor integridade celular, menor infiltrado inflamatório e fibrose, CD31 demonstrou aumento da densidade capilar do grupo com CTTAH comparado ao grupo de FEV e controle.

CONTI *et al.* (2015) usaram lipoaspirado de abdômen e regiões trocântéricas sob técnica tumescente de 13 pacientes. O protocolo de criopreservação incluiu ACP composto por glicerol 10%, HSA 0,1% e sacarose 0,1M em proporção de 1:3, mantido em bolsas de criopreservação, submetidas a resfriamento contínuo (-10°C/minuto) e posteriormente transferidas para fase de vapor do tanque de nitrogênio líquido por duas semanas. A morfologia dos tecidos adiposo fresco e criopreservado foi avaliada por microscopia eletrônica e por ressonância nuclear magnética. CTTAH foram cultivadas até a quinta passagem, para avaliar viabilidade celular (ensaio de fluorescência e MTT), taxa de expansão das células, perfil imunofenotípico (CD73, CD105, CD45, CD34) e capacidade de diferenciação (adipogênica e osteogênica). Estudo *in vivo* em 26 camundongos *nude* divididos em dois grupos: enxerto de gordura com tecido fresco; enxerto de gordura com tecido criopreservado. Os enxertos

foram realizados com injeção de 0,2ml de tecido fresco ou criopreservado em subcutâneo de região dorsal com agulha 18-gauge e mantidos por seis dias. Os enxertos foram avaliados por ressonância nuclear magnética. O estudo demonstrou preservação da viabilidade, capacidade de expansão, manutenção dos marcadores de superfície e capacidade de diferenciação das células-tronco. Houve redução do volume do enxerto de gordura criopreservada, quando comparada ao enxerto de gordura fresco.

DEVITT *et al.* (2015) analisaram os efeitos da criopreservação de tecido adiposo de 32 doadores (dermolipectomia abdominal) por períodos de até 1 ano (n = 10), 1 a 2 anos (n = 5), e mais de 2 anos (n = 17), em tubos de 50 ml sem ACP a -70°C. O tecido foi descongelado em temperatura ambiente e processado por digestão enzimática e as células da FEV cultivadas. Não houve comparação com células obtidas de tecido fresco. Análise das CTTAH foi realizada por meio de contagem de células viáveis, citometria de fluxo (CD44, CD45 e CD105) e ensaios de diferenciação adipogênica e osteogênica. O tempo de criopreservação foi inversamente proporcional ao número e viabilidade das células (decaindo de 75% em menos de um ano de criopreservação, 58% entre um e dois anos e 50% em mais de dois anos), manutenção do potencial de diferenciação adipogênica e osteogênica e do perfil imunofenotípico das CTTAH de tecido criopreservado mantendo positividade para marcador mesenquimal CD105, negativo para marcador hematopoiético CD45 e marcador de células precursoras pericíticas CD34.

ROATO *et al.* (2016) criopreservaram tecido de 80 pacientes divididos em 4 grupos, de acordo com uso ou não de anestésico local e DMSO 10% ou trealose como ACP. O tecido foi criopreservado em tubos de cinco ml a -20°C , -80°C ou -196°C , entretanto o período de preservação não foi esclarecido. A viabilidade das células foi testada em dez amostras de cada grupo por meio do teste de MTT e demonstrou maior viabilidade em células do tecido obtido sem anestésico local e criopreservadas com DMSO. Preservação a -20°C demonstrou menor viabilidade, entretanto não houve diferença entre -80°C e -196°C . A presença de anestésico local no tecido coletado reduziu a velocidade de crescimento das células cultivadas. O perfil imunofenotípico das CTTAH foi avaliado com os marcadores CD105, CD73, CD44, CD45, CD3, CD271 e ensaios de diferenciação condrogênica e osteogênica demonstraram que a criopreservação não alterou os marcadores e potencial de diferenciação.

DENG *et al.* (2017) compararam criopreservação de lipoaspirado de região abdominal de único doador com trealose ou DMSO a 10% como ACP -196°C por 3 meses, concluindo que a trealose foi tão eficiente como o DMSO para a manutenção da viabilidade das células.

4 MÉTODOS

4.1 DESENHO DE PESQUISA

Este foi um estudo primário, intervencional, experimental, prospectivo, analítico e controlado. Os experimentos foram realizados no Centro de Pesquisa com Célula-tronco e Medicina Regenerativa da Tulane University, de New Orleans, EUA.

4.2 CASUÍSTICA

O tecido adiposo humano foi obtido através de lipoaspiração eletiva de abdômen e flancos de oito pacientes, sob protocolo de pesquisa e aprovação do Comitê de Ética da Western Institution Review Board (Protocolo n. 1.138.160, de março de 2015, apresentado no Apêndice 1) e homologado pelo Comitê de Ética e Pesquisa (Projeto CEP/UNIFESP n. 1.652/2016, apresentado no Apêndice 2). Todos os pacientes assinaram termo de consentimento informado antes da coleta do tecido (Apêndice 3).

Como critérios de inclusão, foram selecionados lipoaspirados de pacientes saudáveis que assinaram o termo de consentimento livre esclarecido. Critério de exclusão consistiu em recusa do paciente em assinar o termo de consentimento informado.

Com base na viabilidade das células da FEV, foi estimada a amostra a ser coletada, calculada considerando encontrar uma diferença entre os testes de viabilidade de pelo menos um desvio padrão; assim, com poder de 80% e confiança de 95%, a amostra necessária para a realização do estudo foi de oito voluntários.

A média do índice de massa corporal (IMC) dos pacientes foi de $26,88 \pm 3,27 \text{ kg/m}^2$, com apenas dois pacientes obesos ($\text{IMC} \geq 30 \text{ kg/m}^2$). A idade variou entre 35 e 56 anos ($45,75 \pm 7,5$ anos). A maioria dos pacientes pertencia ao sexo feminino (75%) e tinha pele branca (87,5%), como mostra a Tabela 1.

Tabela 1 – Caracterização demográfica da amostra (n=8)

Doador	Idade	Sexo	Etnia	IMC
Doador 1	39	Masculino	Negro	31,75
Doador 2	56	Masculino	Branco	25,86
Doador3	35	Feminino	Branco	25,27
Doador 4	47	Feminino	Branco	21,96
Doador 5	43	Feminino	Branco	30,95
Doador 6	41	Feminino	Branco	26,99
Doador 7	54	Feminino	Branco	24,44
Doador 8	51	Feminino	Branco	27,84
Média ± DP	$45,75 \pm 7,5$			$26,88 \pm 3,27$

IMC = Índice de Massa Corporal ($\text{IMC}=\text{P}/\text{A}^2$).

4.3 DELINEAMENTO DO ESTUDO

Três grupos celulares de mesmos doadores, FEV obtida de tecido adiposo lipoaspirado fresco, FEV de tecido criopreservado e FEV criopreservada foram analisadas. Células cultivadas (CTTAH) de TAF e TAC também foram caracterizadas.

A caracterização do tecido adiposo fresco e criopreservado foi complementada *in vivo* pelo enxerto de TAH em dorso de camundongos transgênicos C57B/6 que expressam a proteína verde fluorescente (PVF) para análise morfológica e estrutural da integração do enxerto e capacidade de servir como arcabouço estrutural. Os experimentos *in vivo* foram aprovados pelo *Institutional Animal Care and Use Committee* da Tulane University (Protocolo 4399/2015, Apêndice 4) e pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Paulo – Unifesp (Aprovação n. A4499-01/2016, Apêndice 5) e realizados de acordo com as normativas do laboratório do Departamento de Medicina Corporativa da Tulane University (www2.tulane.edu).

4.4 PROCEDIMENTOS

4.4.1 Processamento e criopreservação do tecido adiposo

O tecido adiposo humano (TAH) lipoaspirado de cada doador foi transferido para o laboratório em recipientes selados e as amostras foram mantidas à temperatura ambiente antes do processamento (Protocolo apresentado no Apêndice 6).

Um total de 100 ml de TAH de cada doador foi lavado em solução salina tamponada (SST) e centrifugada duas vezes a 1200 rpm (300 G) para remoção de óleo e células hemáticas. Após esse processo, uma alíquota de 50 ml foi ressuspensa em solução de criopreservação 2x, que consistia em soro fetal bovino/SFB 70%, DMSO 20%, meio estromal 10% (Meio de *Eagle* modificado por Dulbecco/Meio F-12 de Ham suplementado com SFB 10% e penicilina/estreptomicina 1%, Thermo Fisher Scientific, Logan, UT, EUA) e transferida para tubos de criopreservação de 5 ml. Os tubos foram levados a um *freezer* de -80°C (Sanyo, Japão) em *containers* de etanol (Mr. Frosty™, Nalgene Cryo 1°C Freezing Container, Thermo Scientific, Logan, UT, EUA) para congelamento lento e transferidos para um tanque de nitrogênio líquido (LS 3000 Lab Systems Taylor Warton, Minnetonka, MN, EUA) após 24 horas, para preservação por longo período. Tecido adiposo criopreservado, agora referido como TAC, foi descongelado para experimentos depois de quatro semanas. O tecido adiposo não criopreservado, agora referido como tecido adiposo fresco (TAF), foi processado logo após a lavagem e separação do tecido a ser criopreservado.

Todos os processos e experimentos *in vitro* foram realizados em cabine de biossegurança (Class II A/B3 Biological Safety Cabinet, Thermo Forma, EUA). Inicialmente, o TAH foi transferido do recipiente selado para garrafas de processamento de tecido (Thermo Scientific, Rochester, NY, EUA). Para digestão enzimática, o TAH foi lavado três vezes em SST até que o fluido se tornasse claro e livre de excesso de células hemáticas. Após a remoção da camada oleosa superior e o fluido decantado, foi iniciada a digestão enzimática com solução recém-preparada de colagenase tipo I, que consiste em

colagenase tipo I 0,1% (Collagenase Type I, Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, NJ, EUA), fração V de albumina sérica bovina/ASB 1% (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA) e CaCl_2 0,2 mM em SST em volume equivalente ao do tecido processado (50 ml de solução para 50 ml de tecido processado). A garrafa contendo TAH e solução de colagenase tipo I foi transferida para a incubadora/agitadora (Incubator Shaker, Innova 4200, New Brunswick Scientific, NJ, EUA) e digerida por uma hora a 37°C, 5% CO_2 . Após esse período, a garrafa foi delicadamente agitada e centrifugada (Table Top Centrifuge, Sorval Legend T, Kendro, Alemanha) por cinco minutos a 1200 rpm (300 G). Essa etapa foi repetida duas vezes, até a obtenção de precipitado celular no fundo da garrafa. O resíduo de tecido e solução foram aspirados cuidadosamente sem afetar o precipitado celular, que foi ressuspenso em 15 ml de meio estromal (Meio de Eagle modificado por Dulbecco/Meio F-12 de Ham suplementado com SFB 10% e penicilina/estreptomicina 1%, HyClone, Thermo Fisher Scientific, Logan, UT, EUA) e filtrado através de um filtro celular estéril de 100 μm (Sterile Cell Strainer, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA) e transferido para tubos cônicos de 15 ml (Nalgene™ Centrifuge Tubes, Thermo Fisher Scientific, Logan, UT, EUA). A suspensão celular obtida do TAF será referida como FEV TAF, e a de TAC, como FEV TAC.

4.4.2 Rendimento e viabilidade celular da FEV TAF e criopreservação de FEV TAF

As suspensões celulares de FEV TAF tiveram suas células contadas e a análise de viabilidade foi realizada através de ensaio com *orange acridine/ethidium bromide* (OA/EB), sob microscópio de fluorescência (Nikon, Eclipse E800, Melville, NY, EUA). Para isso, 10 µl de suspensão celular foram diluídos no mesmo volume de OA/EB e transferidos para um hemocitômetro. A contagem das células vivas marcadas em verde e as mortas marcadas em laranja foi feita em oito quadrantes do hemocitômetro por dois pesquisadores independentes e feita a média dos valores encontrados por cada um. A média das contagens, multiplicada por dois, pelo fator de diluição no corante e por 10.000, resulta no total de células por ml de suspensão celular. Esse número de células liberado após o processamento de 1 ml de tecido adiposo é a produção ou rendimento celular. Dado que o volume de suspensão celular era de 15 ml, a quantidade de células obtidas pelo processamento de 50 ml de TAH foi totalizada. A viabilidade celular foi calculada dividindo o número de células vivas pelo total (células vivas mais células mortas). Após a contagem, cerca de um milhão de células foi separado para citometria de fluxo. Outra alíquota de um milhão de células foi colocada em uma garrafa de cultura (T75 flasks, Genesee Scientific, San Diego, CA, EUA) e dez mil células separadas para ensaio de formação de colônia-fibroblasto (UFC-F).

Uma quantidade estimada de dez milhões de células FEV TAF foi centrifugada por cinco minutos a 1.200 rpm (300 G) formando um precipitado celular no fundo do tubo cônico de 15 ml, o meio estromal foi aspirado e as células foram ressuspensas em 4 ml de meio de criopreservação contendo SFB 80%, DMSO 10% em meio estromal 10%. Foram criopreservados quatro criotubos de 2 ml contendo 2,5 milhões de FEV TAF. Os frascos foram colocados em recipientes de

etanol para redução lenta e progressiva da temperatura, em *freezer* de -80°C, e transferidos no dia seguinte para um tanque de nitrogênio líquido, onde foram mantidos por quatro semanas. As FEV TAF criopreservadas serão referidas agora como FEV C e foram descongeladas após quatro semanas para os mesmos experimentos de caracterização que foram realizados para FEV TAF e FEV TAC, comparando os três grupos celulares de mesmos doadores.

4.4.3 Descongelamento do TAC

As amostras de TAC foram descongeladas após quatro semanas, em banho-maria (Water Bath, Thermo Scientific, Rochester, NY, EUA) a 37°C, transferidas a tubos cônicos de 50 ml (Thermo Scientific, Rochester, NY, EUA). A solução de criopreservação foi diluída em meio estromal, centrifugada por cinco minutos a 300 G. A seguir, o fluido foi aspirado e a lavagem repetida, para remoção máxima de solução de criopreservação. O TAC recém-descongelado foi processado da mesma forma que o TAF (descrito anteriormente) para o isolamento de FEV de TAC, agora referido como FEV TAC e caracterizado da mesma forma que FEV TAF e FEV C.

4.4.4 Descongelamento de FEV C

As células da FEV criopreservadas foram descongeladas após quatro semanas, em banho-maria (Water Bath, Thermo Scientific, Rochester, NY, EUA) a 37°C e transferidas para tubos cônicos de 15 ml (Thermo Scientific, Rochester, NY, EUA). Meio estromal foi usado para diluir a solução de criopreservação e a amostra foi então centrifugada por cinco minutos a 300 G. A seguir, o sobrenadante foi aspirado e o precipitado celular ressuspenso em meio estromal. A contagem e viabilidade celular foram feitas da mesma maneira que para FEV TAF e FEV TAC e também caracterizada através de citometria de fluxo, UFC-F e cultura celular.

4.4.5 Ensaio de unidade formadora de colônia - fibroblasto para FEV

FEV TAF, FEV TAC e FEV C foram cultivadas em placas de seis poços, em densidades de 5.000, 2.500, 1.000, 500, 250 ou 100 células por poço, e mantidas em cultura com 2 ml de meio estromal em incubadora a 37°C, 5% CO₂. O meio foi trocado após uma semana e a cultura mantida por duas semanas, quando as placas foram lavadas com SST, fixada em paraformaldeído 1% e tingidas com azul de toluidina 1%. Agregados celulares de mais de 32 células foram contados como colônias, em observação sob microscópio invertido de contraste de fases (Phase Contrast Microscope, Motic AE2000, Stellar Scientific, Baltimore, MD, EUA).

4.4.6 Painel imunofenotípico das células da FEV através de citometria de fluxo

Após determinação de número e viabilidade, as células da FEV TAF, FEV TAC e FEV C foram caracterizadas com base em seus níveis de detecção de fluorescência de marcadores de superfície, usando citometria de fluxo (Beckman Counter Epixs FC 500, Beckman Counter, Miami, FL, EUA) e programa CXP (CPX Software, Beckman Counter, Miami, FL, EUA). O painel incluiu CD73 (ecto-5-nucleotidase como marcador estromal), CD36 (marcador de adipócito), CD34 (marcador de célula endotelial capilar), CD146 (marcador de pericito), CD45 (marcador hematopoiético), CD31 (marcador vascular), CD3 (marcador de células T) e CD19 (marcador de células B) com IgG-PE, IgG-FITC, IgG ECD e IgG PC7 como controles. Os valores obtidos refletiram a porcentagem de expressão detectada dos antígenos de superfície analisados, normalizados com base no isotipo de controle, isto é, subtraído o valor do controle. A lista de anticorpos e isotipos é apresentada no Quadro 1.

Quadro 1 – Anticorpos marcadores de superfície para imunofenotipagem por citometria de fluxo das células da FEV

Protocolo	Anticorpo	Cor	Fabricante	Catálogo
1	CD36	FITC	Coulter	IM0766
	CD34	PE	Coulter	IM1871
	CD19	ECD	Coulter	IM2708
	CD45	PeCy7	Coulter	IM3548U
2	CD3	PeCy7	Coulter	6607100
	CD146	PE	Coulter	A07483
	CD31	FITC	BD Biosciences	558068
3	CD73	PE	BD Biosciences	550257
4	IgG	FITC	Coulter	A17599
	IgG	PE	Coulter	A17599

CD = *clusters of differentiation*; IgG = imunoglobulina; FITC = fluorocromo isotiocinato de fluoresceína; PE = fluorocromo ficoeritrina; ECD = fluorocromo ECD; PeCy7 = fluorocromo PeCy7.

Para o preparo da citometria de fluxo, um milhão de células de FEV foi centrifugado em um microtubo Eppendorf de 1,5 ml durante cinco minutos a 1.200 rpm (300 G) à temperatura ambiente, o meio estromal foi aspirado e as células foram ressuspensas em 400 µl de SST fria. Alíquotas de 50 µl de suspensão celular foram distribuídas em quatro microtubos, às quais foram adicionados anticorpos monoclonais conjugados com fluorocromo. As amostras foram incubadas no escuro durante 30 minutos à temperatura ambiente. Após o período de incubação, as células foram lavadas com 1 ml de SFB 1% em SST fria por três vezes e ressuspensas em cada Eppendorf em 500 µl de formaldeído 1% em SST, transferidas para tubos de poliestireno e deixadas a 4°C para a fixação antes da análise.

4.4.7 Cultura celular e criopreservação de CTTAH

Cerca de um milhão de células de FEV foram cultivadas em garrafas T75 em meio estromal. O meio de cultura foi trocado a cada dois ou três dias, até confluência das células, observada em microscópio invertido de contraste de fases. CTTAH foram destacadas das garrafas por tripsinização e as células foram contadas em hemocitômetro com corante Azul de Tripan, sob microscópio invertido de contraste de fases (Phase Contrast Microscope, Motic AE2000, Stellar Scientific, Baltimore, MD, EUA). Aproximadamente um milhão de células foram criopreservadas, da mesma forma que a FEV. A CTTAH obtida de FEV TAF agora é referida como CTTAH TAF, enquanto a obtida de FEV TAC é referida como CTTAH TAC; ambas foram caracterizadas posteriormente.

4.4.8 Descongelamento de CTTAH

As CTTAH criopreservadas foram descongeladas após quatro semanas, em banho-maria (Water Bath, Thermo Scientific, Rochester, NY, EUA) a 37°C e transferidas para tubos cônicos de 15 ml (Thermo Scientific, Rochester, NY, EUA). Meio estromal foi usado para diluir a solução de criopreservação e a amostra foi então centrifugada por cinco minutos a 300 G. A seguir, o sobrenadante foi aspirado e o precipitado celular ressuspenso em meio estromal. A contagem e viabilidade

celular foi feita através de ensaio de Azul de Tripán e contagem em hemocitômetro sob microscópio invertido de contraste de fases (Phase Contrast Microscope, Motic AE2000, Stellar Scientific, Baltimore, MD, EUA). Após descongelamento, as CTTAH foram caracterizadas com base em perfil imunofenotípico por citometria de fluxo, UFC-F e potencial de diferenciação adipogênica e osteogênica.

4.4.9 UFC-F para CTTAH

CTTAH de TAF e TAC foram cultivadas em placas de 6 poços, em triplicatas com densidades de 100 ou 50 células por poço e mantidas em cultura com 2 ml de meio estromal, em incubadora a 37°C, 5% CO₂. O meio foi trocado após uma semana e a cultura mantida por duas semanas, quando as placas foram lavadas com SST, fixadas em paraformaldeído 1% e tingidas com azul de toluidina 1%. Agregados celulares de mais de 32 células foram contados como colônias, em observação sob microscópio invertido de contraste de fases (Phase Contrast Microscope, Motic AE2000, Stellar Scientific, Baltimore, MD, EUA).

4.4.10 Perfil imunofenotípico das CTTAH

Após contagem e determinação da viabilidade celular, CTTAH de TAF e TAC de primeira passagem foram expandidas em cultura e caracterizadas com base na identificação de marcadores celulares de superfície CD73 (marcador estromal), CD90, CD29, CD105, CD44, CD 34 (marcador de célula endotelial capilar) e CD45 (marcador hematopoiético) com IgG-PE, IgG-FITC como controles, utilizando citometria de fluxo (Beckman Counter Epixs FC 500, Miami, FL, EUA) com programa CXP (Beckman Counter, Miami, FL, EUA).

Como já descrito para FEV, 1,5 milhão de células de CTTAH foram centrifugadas em um microtubo Eppendorf de 1,5 ml durante cinco minutos a 1.200 rpm (300 G) à temperatura ambiente, o meio estromal foi aspirado e as células foram ressuspensas em 400 µl de SST fria. Alíquotas de 50 µl de suspensão celular foram distribuídas em quatro microtubos às quais foram adicionados anticorpos monoclonais conjugados com fluorocromo. As amostras foram incubadas no escuro durante 30 minutos à temperatura ambiente. Após o período de incubação, as células foram lavadas com 1 ml de SFB 1% em SST fria por três vezes e ressuspensas em cada Eppendorf, em 500 µl de formaldeído 1% em SST, transferidas para tubos de poliestireno e deixadas a 4°C para a fixação antes da análise. Os valores obtidos refletem a porcentagem de expressão detectada dos antígenos de superfície analisados, normalizados com base no isotipo de controle, isto é, subtraído o valor do controle, com painel de marcadores como mostra o Quadro 2.

Quadro 2 – Anticorpos marcadores de superfície para imunofenotipagem por citometria de fluxo para CTTAH

Protocolo	Anticorpo	Cor	Fabricante	Catálogo
1	CD29	PE	eBioscience	12-0297
2	CD105	PE	eBioscience	12-1057
3	CD45	PE	eBioscience	12-0459
4	CD34	PE	BD Biosciences	348057
5	CD44	FITC	BD Biosciences	347943
6	CD73	PE	BD Pharmigen	550257
7	CD90	PE	BD Pharmigen	55596
8	IgG	PE	BD Biosciences	555749
9	IgG	FITC	BD Biosciences	554679

CD = clusters of differentiation; IgG = imunoglobulina; FITC = Fluorocromo isotiocinato de fluoresceína; PE =fluorocromo ficoeritrina.

4.4.11 Histoquímica e rt-PCR para ensaios de diferenciação das CTTAH

CTTAH TAF e CTTAH TAC foram cultivadas em placas de doze poços até atingir confluência, quando foram induzidas a diferenciação adipogênica (DMEM High Glicose/F-12 (Hyclone, Logan, UT, EUA), 3% FBS, 1% antibiótico/antimicótico, 33 μ M biotina, 17 μ M pantotenato, 100 nM insulina, 1 μ M dexametasona, 500 μ M isobutilmetilxantina e 5 μ M rosiglitazone) ou osteogênica (1 nM dexametasona, 10 mM β glicerolfosfato e 50 μ M ascorbato-2-fosfato) com meio de cultura apropriado e mantendo poços com meio estromal como controles para ambas linhagens. A indução foi feita durante três dias e posteriormente mantidas (o meio de manutenção adipogênica

exclui IBMX e rosiglitazone) com troca de meio a cada dois ou três dias. Após 14 dias, os respectivos poços foram fixados e corados para evidenciação de Oil Red O (poços de diferenciação adipogênica) ou vermelho de alizarina (poços de diferenciação osteogênica), com seus respectivos controles não diferenciados. Imediatamente após coloração, as placas foram observadas e os poços fotografados sob microscópio invertido de contraste de fases (Phase Contrast Microscope, Motic AE2000, Stellar Scientific, Baltimore, MD, EUA). A quantificação da coloração foi realizada através de eluição dos agentes corantes e leitura de absorbância em espectrofotômetro (FLUOStar Optima Plate Reader, BMG Labtech, Alemanha). Para a eluição do Oil Red O foram utilizados 400 µl de isopropanol 100% a cada poço, e para vermelho de alizarina, 400 µl de cloreto de monoidrato de cetilpiridíio 10%. Após 30 minutos, as diluições dos corantes de cada poço foram transferidas em triplicata para uma placa de 96 poços e a leitura da absorbância foi realizada a 540 nm com poços vazios servindo como controle e seus valores subtraídos da leitura dos poços de experimentos. A razão entre a absorbância de poços de células induzidas a diferenciação, dividida pela dos poços controle, foi então determinada.

Poços de células mantidas em meio estromal, adipogênico e osteogênico foram coletados para rt-PCR. O RNA total foi extraído dos precipitados celulares através do RNeasy[®] Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, EUA), de acordo com instruções do fabricante. Após isso, cDNA foi sintetizado através de transcriptase reversa, usando iScript[™] cDNA Synthesis Kit (Hercules, CA, EUA). Real Time-PCR foi realizado, utilizando CFX96 Touch[™] Real-Time PCR Detection System

(Hercules, CA, EUA), como segue: um ciclo a 95°C por 4 minutos, 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto, e então uma curva de fusão de 55°C a 95°C, com incremento de 0,5°C. *Cyclophilin B* (CyCB) foi usado como gene controle.

A sequência de *primers* relacionada ao caminho adipogênico foi: *peroxisome proliferator-activated receptor gamma* (PPARgamma), *CCAAT/enhancer binding protein alpha* (C/EBP Alpha), leptina (LEP) e adiponectina (AdipoQ). A sequência de *primers* relacionada à diferenciação osteogênica foi: RunX2, ALPL, osteocalcina (OCN) e osteopontina (OPN) (Quadro 3). O rt-PCR foi realizado em triplicata por doador e os dados estão representados como amplificação da expressão com resultados encontrados para cada mRNA normalizado em relação à expressão do controle.

Quadro 3 – Lista de genes relacionados à adipogênese e osteogênese utilizados para rt-PCR das amostras de CTTAH TAF e CTTAH TAC induzidas ou não induzidas à diferenciação

Gene	Catálogo	Direto	Reverso
PPARγ	NM_015869	AGGCGAGGGCGATCTTG	CCCATCATTAAGGAATTCATGTCATA
C/EBPα	NM_004364.2	GGGTCTGAGACTCCCTTTCCTT	CTCATTTGGTCCCCCAGGAT
LEP	NM_000230.1	GGTTGCAAGGCCAAGAA	ACATAGAAAAGATAGGGCCAAAGC
AdipoQ	NM_004797	GGCCGTGATGGCAGAGAT	TTTCACCGATGTCTCCCTTAGG
CyCB	NM_000942.4	GGAGATGGCACAGGAGGAAA	CGTAGTGCTTCAGTTGAAGTTCTCA
Runx2	NM_001015051.3	GCAAGTTCAACGATCTGAGAT T	AGACGGTTATGGTCAAGGTGAAA
ALPL	NM_000478.3	AATATGCCCTGGAGCTTCAGAA	CCATCCCATCTCCCAGGAA
OCN	NM_003118	GCGGGACTGGCTCAAGAAC	GATCTTCTCACCCGAGCTT
OPN	NM_001040058.1	CAGCCTTCTCAGCCAAACG	GGCAAAAGCAAATCACTGCAA

PPAR γ = gene *peroxisome proliferator-activated receptor gamma*; C/EBP α = gene *enhancer binding protein alpha*; LEP = gene leptina; AdipoQ = gene adiponectina; RunX2 = gene RunX2, ALPL = gene fosfatase alcalina; OCN = gene osteocalcina; OPN = gene osteopontina.

4.4.12 Modelo animal de enxerto de gordura em camundongos C57b transgênicos PVF

Para os experimentos *in vivo* foram usados 18 camundongos machos, adultos (de 2 a 4 meses de idade), transgênicos C57Bl/6-Tg (UBC-GFP) 30Scha/J *strain* (Jackson Laboratory, Sacramento, CA, EUA), que expressam proteína verde fluorescente (PVF). Os animais, reproduzidos no laboratório do Departamento de Medicina Corporativa da Tulane University, mantidos em trios em gaiolas numeradas e identificadas, foram aleatoriamente fornecidos nos dias dos experimentos (aleatorização realizada pelo pesquisador responsável pela distribuição dos animais através da página www.randomization.com).

Os animais foram distribuídos em dois grupos experimentais para enxerto de gordura (EG): Grupo I – EG TAF; Grupo II – EG TAC. Os 9 animais do Grupo I receberam 2 áreas de enxerto de TAF, totalizando 18 amostras de EG TAF. Os 9 animais do Grupo II receberam 2 áreas de TAC (tecido de mesmos doadores do TAF usado no Grupo I), também totalizando 18 amostras de EG TAC. Os camundongos foram anestesiados por anestesia inalatória com gás isoflurano e posicionados ventralmente. Foi realizada assepsia e antissepsia com cloroexedina tópica e tricotomia da região dorsal do camundongo. O EG foi realizado através de cânula de 0,9mm de ponta romba (Tulip SL 0.9mm micro cânula, San Diego, CA, USA) em seringa de 1 cc. Cada animal recebeu duas áreas de 0,25 ml de EG em *paniculum carnosum* de região

dorsal a 1 cm da linha média, através de único ponto de entrada no ponto médio da linha média lombar.

Os animais foram mantidos em gaiolas com temperatura e iluminação controladas, com água e alimentos *ad libitum* por nove semanas, quando foram submetidos a morte indolor induzida por CO₂ e deslocamento cervical.

Os animais foram posicionados ventralmente, realizada uma única incisão em linha média da região dorsal, com afastamento da pele lateralmente. Os EG evidenciados sobre a musculatura dorsal foram removidos, pesados em balança de precisão e medidos com paquímetro digital (Figura 1). Amostras frescas foram levadas imersas em tubos de 15 ml em SST para microscopia confocal e posteriormente fixadas em formaldeído 10% para histologia e imuno-histoquímica.

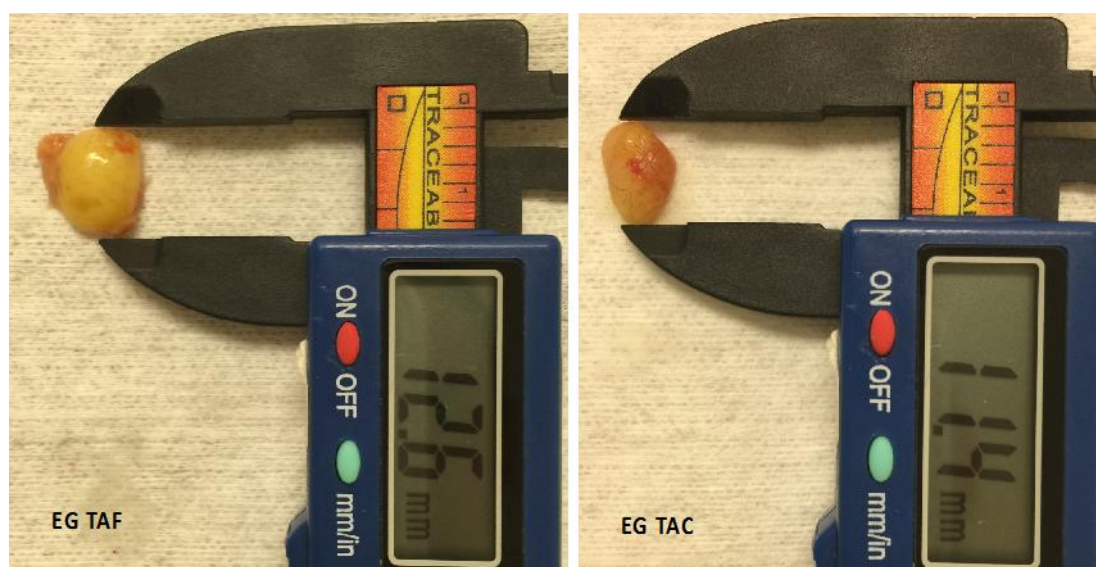


Figura 1 – Fotografias representativas do aspecto macroscópico dos EG TAF à esquerda e EG TAC à direita após remoção.

4.4.13 Microscopia confocal

Amostras dos enxertos de gordura removidos após nove semanas foram seccionadas em seu maior eixo e uma secção de aproximadamente 20 μm foi mantida em SST em placa para observação em microscópio confocal de fluorescência (Nikon, A1+ Confocal Microscope System, Melville, NY, EUA), para identificação de sinal de PVF. As imagens obtidas foram analisadas através do aplicativo de análise de imagens Image J (<http://imagej.nih.gov/ij>).

4.4.14 Histologia e imuno-histoquímica

Secções dos enxertos de gordura de ambos grupos experimentais (EG TAF e EG TAC) foram preparados no Laboratório de Histologia do Centro de Pesquisa com Célula-tronco e Medicina Regenerativa da Tulane University.

As amostras extraídas e fixadas em formaldeído 10% foram processadas automaticamente (Thermo Scientific Excelsior ES Tissue processor, Fisher Scientific, Logan UT, EUA). Secções seriadas de 5 μm de espessura foram coradas com hematoxilina e eosina (H&E) e tricrômio de Masson (TM) (Leica Microsystems, and Leica St 5020 Autostainer, Buffalo Grove, IL, EUA).

Para imuno-histoquímica, as secções foram coradas, utilizando PVF (anticorpo policlonal de coelho Anti-PVF 2mg/ml 100 μl , Invitrogen Molecular Probes, Eugene, Oregon, EUA), perilipina (Rb

PAB para perilipina A 110 µl, Abcam, Cambridge, MA, EUA) e CD31 (DSHB Produto hibridoma 2H8, Iowa, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. As lâminas foram aquecidas em uma plataforma de aquecimento a 57°C durante 30 minutos e submetidas à desparafinização. As lâminas foram enxaguadas com as seguintes soluções: xileno, duas vezes durante cinco minutos; etanol (EtOH) 100%, duas vezes durante dois minutos; EtOH 95%, duas vezes durante dois minutos; EtOH 70%, uma vez durante dois minutos; EtOH 50%, uma vez durante dois minutos; e, finalmente, com água durante dois minutos. As secções de tecido foram envolvidas com uma caneta ImmEdge e lavadas duas vezes durante cinco minutos em Tris-HCl 20 mM pH 8,0. Em seguida, as secções foram incubadas em solução de proteinase K 0,4 mg/ml (em Tris-HCl a pH 8,0) durante 15 minutos, a 37°C, em câmara úmida. As lâminas foram então lavadas abundantemente com água e, posteriormente, submetidas a duas lavagens de cinco minutos em TBS-T. Para a coloração do anticorpo, as secções foram cobertas com TBS + 10% SST (contendo anticorpo secundário) + 1% de ASB, incubando-as durante duas horas à temperatura ambiente, em câmara úmida. Em seguida, o anticorpo primário foi aplicado e as secções foram incubadas durante a noite, a 4°C, em câmara úmida. No dia seguinte, as lâminas foram lavadas duas vezes durante cinco minutos em TBS-T. O anticorpo secundário foi aplicado e as secções foram incubadas durante uma hora à temperatura ambiente, numa câmara umidificada protegida de luz. As lâminas foram, então, lavadas duas vezes durante cinco minutos em TBS, seguidas por uma lavagem com água. As lamínulas foram adicionadas ao meio de montagem de manutenção da fluorescência + DAPI (Life Technologies).

As lâminas foram escaneadas através do Image Scan Scope Console (Version 10.2.0.2314) e o programa Arperio ePathology (Version 12.1.0.5029) foi utilizado para guardar e analisar as imagens escaneadas (Leica Biosystems, Buffalo Grove, IL, EUA). O programa Image J (<http://imagej.nih.gov/ij>) foi usado para quantificar o número e características das células, presença de células adiposas nucleadas e intactas, cistos, inflamação, fibrose e outros componentes do tecido conjuntivo.

O tecido adiposo do camundongo foi utilizado como controle positivo para a imuno-histoquímica com coloração para PVF e perilipina (Figura 2).

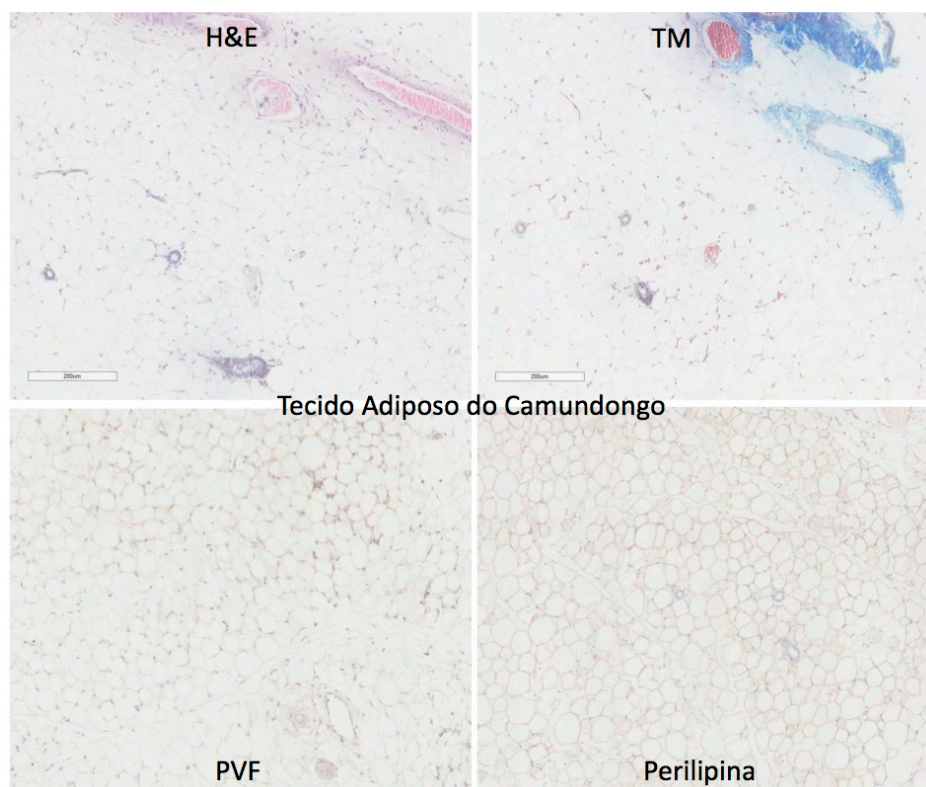


Figura 2 – Tecido adiposo do camundongo com coloração com H&E, TM, perilipina e PVF para controle de normalidade e controle positivo para perilipina e PVF.

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os parâmetros avaliados foram descritos segundo grupos, com uso de medianas e intervalos interquartis (IQR). Como cada voluntário formou as amostras de todos os grupos, foram utilizados testes para medidas pareadas. As comparações dos parâmetros em que não houve perda de amostras nos grupos para o mesmo voluntário foram feitas entre os grupos, com uso de testes Wilcoxon pareado (KIRKWOOD & STERNE, 2006). As análises foram seguidas de comparações múltiplas de Bonferroni (NETER *et al.*, 1996), quando necessárias para verificar

entre quais grupos ocorreram as diferenças. O rendimento celular foi comparado entre os grupos FEV TAF e FEV TAC, UFC-F e rt-PCR de CTTAH TAF e CTTAH TAC, e os enxertos de gordura foram comparados com uso do teste Mann-Whitney (KIRKWOOD & STERNE, 2006).

As análises foram realizadas com uso do aplicativo IBM-SPSS for Windows, versão 20.0, e tabulados com uso do aplicativo Microsoft-Excel 2003, e os testes foram realizados com nível de significância de 5%.

5 RESULTADOS

5.1 TECIDO ADIPOSEO CRIOPRESERVADO MANTÉM RENDIMENTO E VIABILIDADE DE CÉLULAS ESTROMAIS VASCULARES APÓS DIGESTÃO ENZIMÁTICA

O número de células obtidas pelo processamento do tecido adiposo criopreservado (TAC) não foi alterado em relação ao rendimento celular do TAF, não havendo diferença entre os dois grupos ($p = 0.413$) como demonstrado na Tabela 2.

Tabela 2 – Produção celular a partir do processamento de TAH (TAF e TAC) (n=8)

	FEV TAF	FEV TAC	p
Produção	357000	321906	0,413
(nº de células/ml)	(255833; 429405)	(240672; 350266)	

Dados expressos como mediana (IQR). Teste Mann-Whitney.

O tecido adiposo fresco (TAF) produziu número máximo de FEV viáveis (80%). Ainda que FEV TAC e FEV C tenham mantido alta viabilidade (59% para FEV TAC e 64% para FEV C), a redução na viabilidade celular foi significativa para ambos os grupos celulares, quando comparados ao FEV TAF ($p < 0.001$), como mostra a Tabela 3.

Tabela 3 – Viabilidade celular para os três grupos celulares da FEV (FEV TAF, FEV C e FEV TAC) (n=8)

	FEV TAF	FEV C	FEV TAC	p
Viabilidade (%)	80 (0,74; 0,86)	64 (0,54; 0,69)	59 (0,52; 0,67)	<0,001*

Dados expressos como mediana (IQR). Teste de Wilcoxon pareado.

5.2 UFC-F

Células da FEV TAF, FEV C e FEV TAC aderiram ao plástico, mantendo suas propriedades e morfologia. A frequência de colônias resultantes foi mais alta na FEV TAF. Na FEV TAC resultaram colônias menores e menos frequentes, mas sem diferença significativa em relação à FEV TAF, como evidencia a Tabela 4.

Tabela 4 – Porcentagens de UFC-F para os três grupos celulares: FEV TAF, FEV C e FEV TAC (n=8)

	FEV TAF	FEV C	FEV TAC	p
UFC-F (%)	0,59 (0,41; 2,42)	0,51 (0,30; 2,65)	0,10 (0,03; 0,112)	0,102

Dados expressos como mediana (IQR). Teste de Wilcoxon pareado.

5.3 PERFIL IMUNOFENOTÍPICO DAS CÉLULAS DA FEV AUMENTA EXPRESSÃO DE MARCADORES ESTROMAIS E REDUZ EXPRESSÃO DE ANTÍGENOS HEMATOPOIÉTICOS APÓS CRIOPRESERVAÇÃO

O painel de marcadores de superfície celular mostrou aumento significativo na expressão do marcador estromal CD73 para FEV C. O

marcador de adipócitos CD36, de precursores vasculares CD34, de pericitos CD146 e CD31 aumentaram significativamente para FEV C e FEV TAC, em relação à FEV TAF. O marcador hematopoiético CD45 diminuiu significativamente em FEV C e FEV TAC, em relação à FEV TAF. Marcadores de células B e T não sofreram alteração após criopreservação de células ou tecido. A expressão dos marcadores estudados é detalhada nas Tabelas 5 e 6.

Tabela 5 – Perfil imunofenotípico de FEV TAF, FEV C e FEV TAC (n=8)

Marcador Celular de Superfície (%)	FEV TAF	FEV C	FEV TAC	p
CD73	24,5 (21,1; 37,1)	43,1 (35; 49,7)	23,9 (17,5; 30,6)	<0.001*
CD36	23,7 (17,6; 35,5)	43,7 (34,4; 59,6)	60,8 (27,7; 75,2)	<0.001*
CD34	35,5 (29; 50,8)	61,1 (51,1; 73,9)	52 (31,9; 72,9)	<0.001*
CD146	16,7 (10,5; 32)	32,2 (26,3; 43,7)	44,4 (27,6; 57,3)	<0.001*
CD45	41,8 (25,1; 53,6)	23,6 (12; 31,3)	20,7 (5; 40)	<0.001*
CD31	19,9 (11,4; 28,8)	35,9 (25; 55,6)	32,2 (26,9; 54,9)	<0.001*
CD3	14,8 (8,2; 18,4)	23,1 (16,6; 27,5)	19,6 (15,8; 27,5)	0.054
CD19	0,57 (0,42; 0,95)	0,61 (0,28; 1,58)	1,5 (0,42; 2,69)	0.188

Dados expressos como mediana (IQR). Teste de Wilcoxon pareado.

Quando analisadas as combinações de marcadores como CD34+/CD36+ (marcador endotelial progenitor e de adipócito positivos), a criopreservação das células da FEV (FEV C) e do tecido adiposo (FEV TAC) provocou aumento significativo desses marcadores. A população positiva para marcador hematopoiético e negativa para marcador de adipócitos (CD45+/CD36-) sofreu diminuição com a criopreservação celular ou de tecido. A população negativa para CD45 e positiva para CD36 sofreu aumento significativo, conforme a Tabela 6.

Tabela 6 – Coexpressão de marcadores de superfície detectados por citometria de fluxo (n=8)

Marcadores Celulares de Superfície (%)	FEV TAF	FEV C	FEV TAC	p
CD34+/CD36-	18,8 (12,6; 27,9)	25,1 (14,5; 30,3)	8,5 (6; 20,1)	<0,001*
CD34+/CD36+	17,3 (11,7; 30,1)	32,7 (27,9; 56,7)	47,5 (18,4; 67,5)	<0,001*
CD34-/CD36-	52,8 (33,5; 63,1)	26,8 (20,6; 35,8)	26,2 (12,9; 54,2)	<0,001*
CD34-/CD36+	10,3 (5,5; 13,3)	11 (6,1; 13,5)	13,7 (9,9; 20,3)	0,048
CD19+/CD36-	0,19 (0,05; 0,22)	0,16 (0,07; 0,46)	0,16 (0,06; 0,4)	0,791
CD19+/CD36+	0,2 (0,1; 0,41)	0,42 (0,35; 0,68)	0,72 (0,22; 1,54)	0,006
CD19-/CD36-	73,3 (57,7; 79,8)	54,5 (38,9; 61)	33,6 (19,7; 68,8)	<0,001*
CD19-/CD36+	26,4 (19,9; 41,5)	46,1 (38,3; 60,4)	65,3 (29,7; 79,9)	<0,001*
CD45+/CD36-	40,6 (26,2; 54,6)	22,5 (14,3; 31,2)	21 (7; 37,5)	<0,001*
CD45+/CD36+	3,1 (1,4; 4,7)	4,7 (2,5; 5,5)	3,1 (1,6; 6,5)	0,020*
CD45-/CD36-	26 (19,7; 36,3)	27,3 (20; 34,9)	12,8 (12; 30,8)	0,090
CD45-/CD36+	16,1 (2,7; 34,4)	44,1 (34,6; 56,4)	62,3 (26,6; 79)	<0,001*
CD19+/CD34-	0,04 (0,02; 0,08)	0,06 (0,03; 0,08)	0,06 (0,03; 0,11)	0,649
CD19+/CD34+	0,33 (0,16; 0,53)	0,54 (0,44; 0,85)	0,9 (0,24; 1,8)	0,011*
CD19-/CD34-	61,2 (43,8; 68,5)	36 (24,7; 43,6)	42,7 (23,3; 64,6)	<0,001*
CD19-/CD34+	38,4 (31,3; 55,4)	63,2 (55,6; 74,5)	56,2 (33,9; 76,2)	<0,001*
CD45+/CD34-	42,8 (26,5; 56)	23,3 (14,3; 31,3)	23 (7,6; 36,9)	<0,001*
CD45+/CD34+	1,53 (0,92; 2,62)	4,11 (1,77; 5,72)	1,83 (0,92; 3,22)	<0,001*
CD45-/CD34-	14,8 (10,7; 22,5)	10,8 (9,4; 14,6)	20,1 (16; 25,3)	0,016*
CD45-/CD34+	36,9 (30,1; 53,1)	60,7 (52,1; 70,3)	54,6 (32,3; 75,4)	<0,001*
CD45+/CD19-	45,3 (27,5; 57,2)	28,3 (16,1; 35,1)	21,5 (8,5; 35)	<0,001*
CD45+/CD19+	4,0 (0,23; 26,38)	0,36 (0,34; 1,05)	1,01 (0,25; 2,18)	0,347
CD45-/CD19-	53,9 (42,5; 72,1)	72,8 (63,9; 83,3)	74,4 (56,7; 91)	<0,001*
CD45-/CD19+	0,09 (0,05; 0,12)	0,19 (0,13; 0,57)	0,18 (0,05; 0,35)	0,168
CD146+/CD31-	8,7 (4,9; 14,8)	10,6 (8,8; 14,3)	15,6 (9,4; 23,8)	0,139
CD146+/CD31+	10,2 (8,9; 18,4)	24,3 (16,3; 32,2)	29,4 (18; 40,8)	<0,001*
CD146-/CD31-	66,4 (50,5; 72,2)	41,8 (32,1; 54,7)	33,2 (17,1; 52,3)	<0,001*
CD146-/CD31+	15,7 (2,9; 20,5)	21,5 (10,4; 25,6)	21,1 (12,7; 26,7)	0,049
CD3+/CD31-	12,6 (6,5; 15,7)	14,9 (8,2; 20,9)	10,2 (6,3; 20)	0,527
CD3+/CD31+	4,1 (2,6; 4,7)	7,3 (6,7; 10,1)	9,1 (4,9; 9,6)	<0,001*
CD3-/CD31-	63 (49,1; 74,4)	41,2 (27,7; 49,1)	40,6 (28,6; 49,9)	<0,001*
CD3-/CD31+	22 (10,6; 32,6)	35 (23,9; 49,2)	35,9 (30; 54,8)	<0,001*

CD3+/CD146-	12,9 (6,7; 16,5)	16,6 (8,8; 24,3)	9,4 (5,8; 19,5)	0,243
CD3+/CD146+	3,1 (2,3; 4,4)	5,5 (4,4; 7,3)	8,9 (5,7; 10,5)	<0,001*
CD3-/CD146-	65,1 (54,7; 73,4)	44,2 (39,1; 50,8)	39,5 (32,1; 51,4)	<0,001*
CD3-/CD146+	17,6 (10,7; 31,1)	29 (24,5; 41,8)	40,3 (26,1; 50,9)	<0,001*

Dados expressos como mediana (IQR). Teste de Wilcoxon pareado.

5.4 CARACTERIZAÇÃO DAS CTTAH OBTIDAS DE TAF E TAC

A viabilidade celular após descongelamento da CTTAH TAF e CTTAH TAC foi de 97% (98,2; 0) e 96% (97,3; 0), respectivamente, não mostrando diferença entre os grupos ($p = 0,21$). As células descongeladas foram cultivadas em concentração aproximada de 95.000 células por cm^2 e atingiram de 80 a 90% de confluência, entre cinco e sete dias, sem diferença entre doadores ou tipos celulares.

5.5 CAPACIDADE DE ADERÊNCIA DAS CTTAH

CTTAH TAF e de TAC mantiveram capacidade de aderência ao plástico e morfologia semelhante ao fibroblasto. Não houve diferença entre as porcentagens de colônias dos dois grupos celulares ($p = 0,109$), como indica a Tabela 7.

Tabela 7 – Porcentagens de UFC-F para os dois grupos celulares: CTTAH TAF e CTTAH TAC (n=8)

	FEV TAF	FEV TAC	p
UFC-F (%)	22,5 (22,5; 0)	21,5 (20,5; 0)	0,109

Dados expressos como mediana (IQR). Teste Mann-Whitney.

5.5 PERFIL IMUNOFENOTÍPICO DAS CTTAH

O perfil de expressão de marcadores de superfície das CTTAH de TAF e TAC não mostrou diferença significativa para nenhum dos marcadores testados, como evidenciam a Tabela 8.

Tabela 8 – Perfil imunofenotípico das CTTAH TAF e CATAH TAC (n=8)

Marcadores de Superfície (%)	CTTAH TAF	CTTAH TAC	p
CD73	91,7 (91,6; 0)	92,6 (87; 0)	0,593
CD90	89,4 (80,7; 0)	93,9 (92,2; 0)	0,109
CD29	94,9 (92,6; 0)	93,5 (93,2; 0)	>0,999
CD105	93,6 (92; 0)	93,5 (93,2; 0)	>0,999
CD44	4,5 (1,94; 0)	12,22 (0,6; 0)	0,285
CD34	4,5 (1,94; 0)	3,2 (2,76; 0)	0,285
CD45	0,26 (0,18; 0)	0 (0,18; 0)	0,109

Dados expressos como mediana (IQR). Teste Mann-Whitney. CD = cluster of differentiation

5.6 ENSAIOS DE DIFERENCIAÇÃO DAS CTTAH

Os potenciais de diferenciação adipogênica e de diferenciação osteogênica das células de ambos os grupos foram comparados, com

base em análise histoquímica e através de rt-PCR, para detecção da expressão de genes relacionados à adipogênese (Figura 3, Tabela 9) ou osteogênese (Figura 4, Tabela 10). Ambos os grupos demonstraram resposta de diferenciação baseada em critérios morfológicos, observando-se gotículas de lipídeo intracitoplasmático coradas em vermelho no caso de diferenciação adipogênica e depósitos de cálcio extracelular corados em vermelho, sem diferença estatística na quantificação através de análise fotográfica e de eluição do corante (espectrofotometria), tanto para diferenciação adipogênica ($p = 0.21$), como osteogênica ($p = 0.22$). As expressões de genes relacionados à adipogênese e osteogênese mostraram incremento significativo de todos os genes examinados em relação às amostras não induzidas à diferenciação, para ambos os grupos ($p < 0.05$). Células mantidas em meio estromal, não induzidas à diferenciação, tiveram níveis de mRNA abaixo dos níveis de detecção (menor que 0,01 relativo ao controle CyCB).

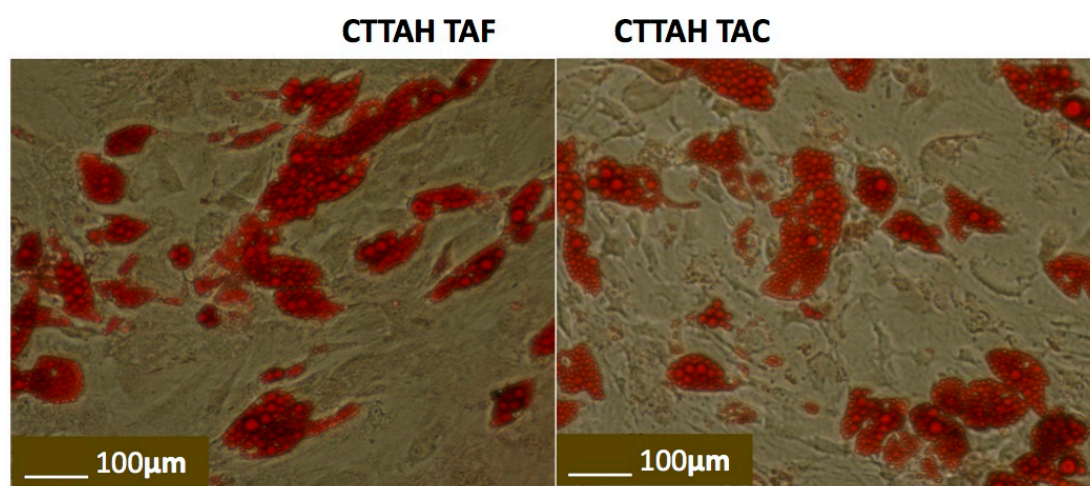
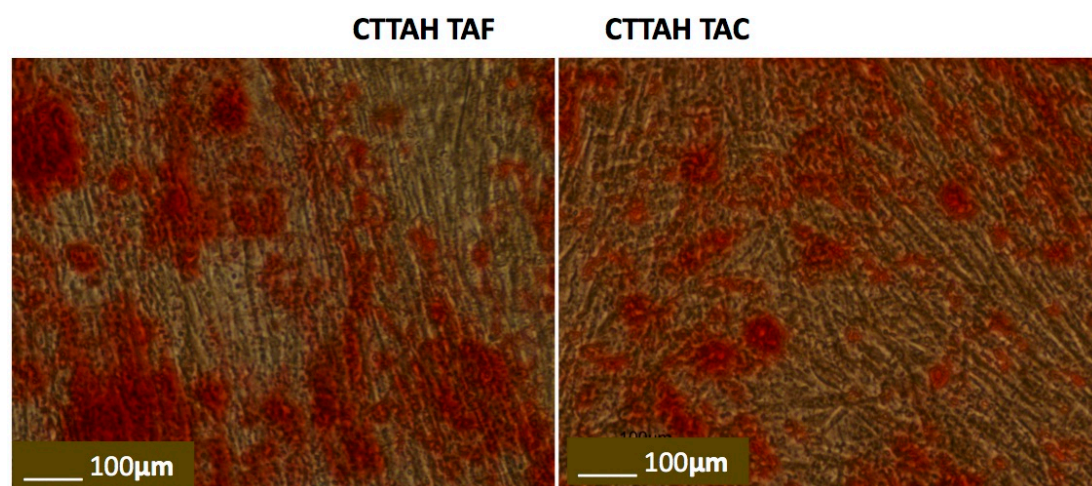


Figura 3 – Diferenciação adipogênica das CTTAH TAF e TAC. Análise histoquímica através de coloração com *Oil Red O*.

Tabela 9 – Diferenciação adipogênica das CTTAH TAF e TAC – rt-PCR (n=8)

Genes Marcadores de Adipogenicidade	CTTAH TAF	CTTAH TAC	P
CEBPα	3,71 (1,66; 0)	8,43 (2,41; 0)	0,285
PPARγ	2,01 (1,11; 0)	2,76 (2,31; 0)	0,593
UCP1	0,87 (0,24; 0)	0,39 (0,33; 0)	0,593
LEP	95,7 (42,8; 0)	246,4 (30,5; 0)	0,285
AdipoQ	369,6 (134,8; 0)	2866,4 (4,3; 0)	0,999

Dados expressos como mediana (IQR). Teste Mann-Whitney. Amplificação da expressão de genes relacionados à diferenciação adipogênica em CTTAH de TAF e TAC induzidas à diferenciação em relação a controles não induzidos através de rt-PCR. PPAR γ = gene *peroxisome proliferator-activated receptor gamma*; C/EBP α = gene *enhancer binding protein alpha*; LEP = gene leptina; AdipoQ = gene adiponectina.

**Figura 4** – Diferenciação osteogênica das CTTAH TAF e TAC. Análise histoquímica através de coloração com vermelho de alizarina.**Tabela 10** – Diferenciação osteogênica das CTTAH TAF e TAC – rt-PCR (n=8)

Genes Marcadores de Osteogenicidade	CTTAH TAF	CTTAH TAC	P
ALPL	1,16 (0,8; 0)	9,51 (1,54; 0)	0,109
RunX2	1,61 (1,09; 0)	3,96 (0,72; 0)	0,285
OCN	0,76 (0,73; 0)	2,04 (0,73; 0)	0,285
OPN	1,24(1,19; 0)	1,92 (0,33; 0)	0,593

Dados expressos como mediana (IQR). Teste Mann-Whitney. Amplificação da expressão de genes relacionados à diferenciação osteogênica em CTTAH de TAF e TAC induzidas à diferenciação em relação a controles não induzidos através de rt-PCR. RunX2 = gene RunX2, ALPL = gene fosfatase alcalina; OCN = gene osteocalcina; OPN = gene osteopontina.

5.7 ENXERTOS DE GORDURA APÓS NOVE SEMANAS DE IMPLANTAÇÃO MANTIVERAM ASPECTO E FUNCIONALIDADE PARA TAF E TAC

O aspecto macroscópico dos EG após nove semanas de implantação mostrou-se como tecido viável e vascularizado para EG TAF e EG TAC, ainda que em algumas amostras notaram-se alguns cistos de óleo e aspecto mais irregular nos EG TAC (Figura 5). O peso do tecido coletado foi maior para EG TAF (0,31mg (0,15; 0,3)) quando comparado ao EG TAC (0,12mg (0,11; 0,2)), com diferença significativa ($p = 0.038$).

A microscopia confocal do tecido coletado não fixado para detecção de sinal de PVF, captado como sinal verde fluorescente, evidenciou infiltrado celular na periferia dos xenoenxertos, representando infiltrado celular do receptor no tecido humano enxertado (Figura 6).



Figura 5 – Fotografia representativa do aspecto macroscópico do enxerto de gordura, nove semanas após transplante de um animal do Grupo I (EG TAC).

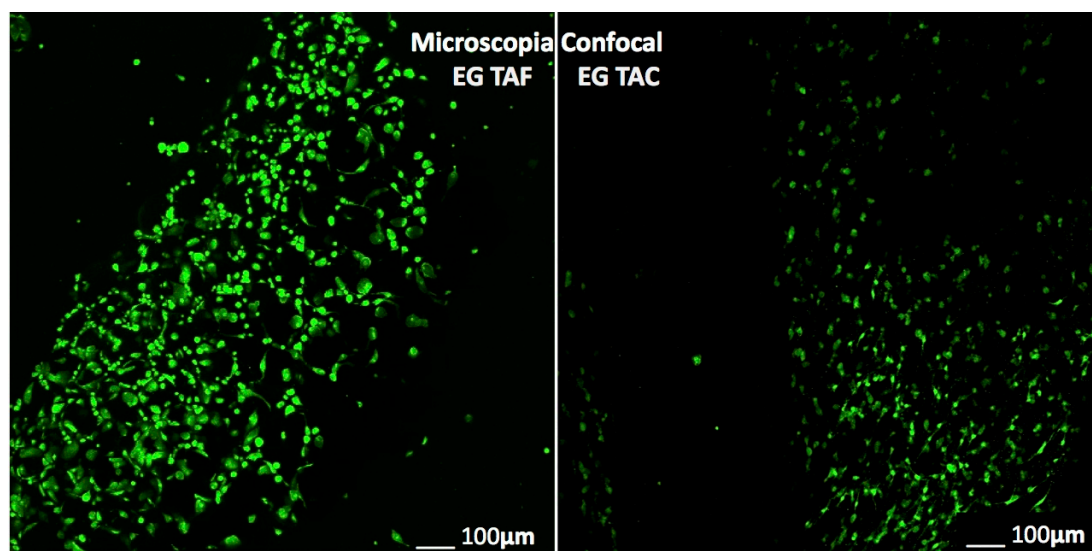


Figura 6 – Fotomicrografia representativa da microscopia confocal do fragmento de EG de TAF e TAC.

A análise histológica mostrou preservação da estrutura geral do tecido, com algumas áreas de fibrose, presença de alguns cistos e discreta cápsula ao redor do tecido transplantado. EG TAC mostrou discreto incremento de infiltrado celular, através de quantificação da coloração com H&E com 6.213,33 (1.411,80; 0) células por campo, quando comparado ao EG TAF com 5.480,22 (3.741,19; 0) células por campo ($p = 0,59$), denotando a presença de células nucleadas intactas e infiltrado inflamatório.

Fibrose e outros componentes do tecido conjuntivo foram evidenciados através de coloração de tricrômio de Masson e sua quantificação mostrou 0,46% (0,22; 0) de positividade para colágeno para EG TAC e 0,45% (0,08; 0) de positividade para EG TAF, sem diferença significativa ($p = 0,93$) (Figura 7).

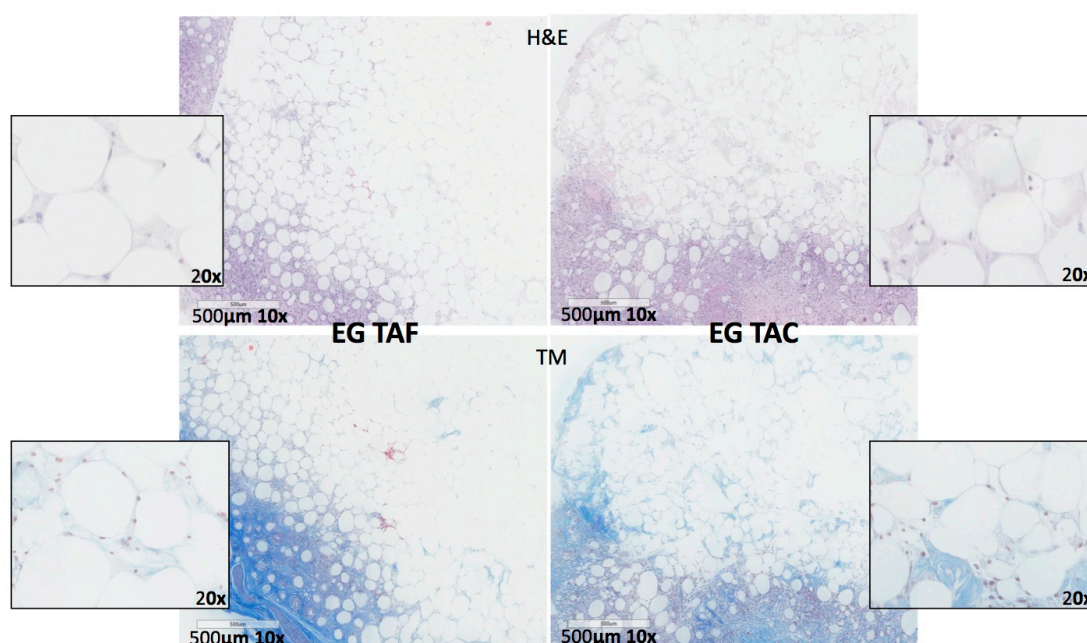


Figura 7 – Histologia – Coloração com H&E (fotos superiores) e TM (fotos inferiores) de EG TAF (lado esquerdo) e EG TAC (lado direito).

Coloração com perilipina mostrou manutenção de adipócitos funcionais dentro do EG para TAF e TAC, após nove semanas de transferência (Figura 8). Coloração para PVF evidenciou adipócitos positivos em áreas mais periféricas do tecido enxertado, enquanto nas áreas mais centrais a grande maioria das células não foi marcada positivamente, denotando a função de arcabouço estrutural permitindo a colaboração do receptor para a manutenção do volume, em conjunto com a persistência de tecido adiposo humano no tecido enxertado (Figura 9).

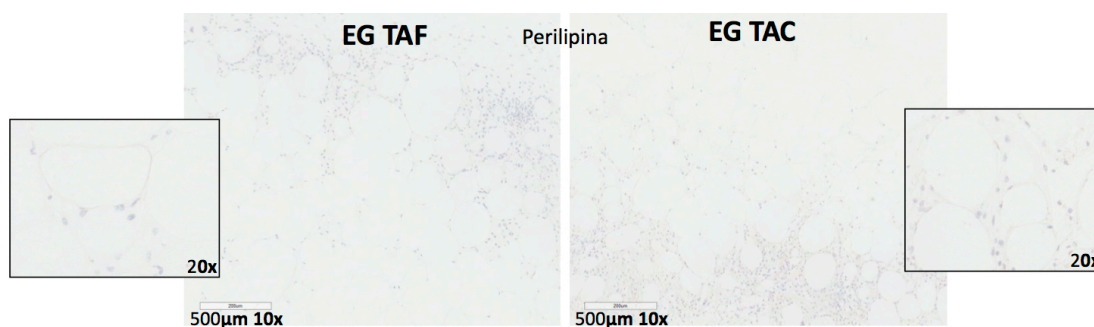


Figura 8 – Imuno-histoquímica com coloração para perilipina de EG TAF (lado esquerdo) e EG TAC (lado direito).

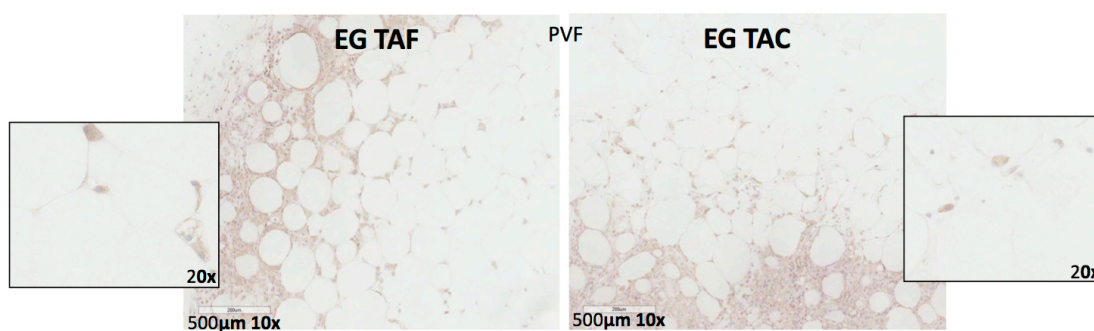


Figura 9 – Imuno-histoquímica com coloração para PVF de EG TAF (lado esquerdo) e EG TAC (lado direito).

Coloração com CD31 foi utilizada no estudo de BAE *et al.* (2015) evidenciando para estruturas vasculares capilares com células endoteliais vasculares marcadas em vermelho e os núcleos corados com DAPI em azul, enfatizando a viabilidade do tecido (Figura 10). No presente estudo não houve diferença na vascularização dos enxertos de tecido fresco e criopreservado.

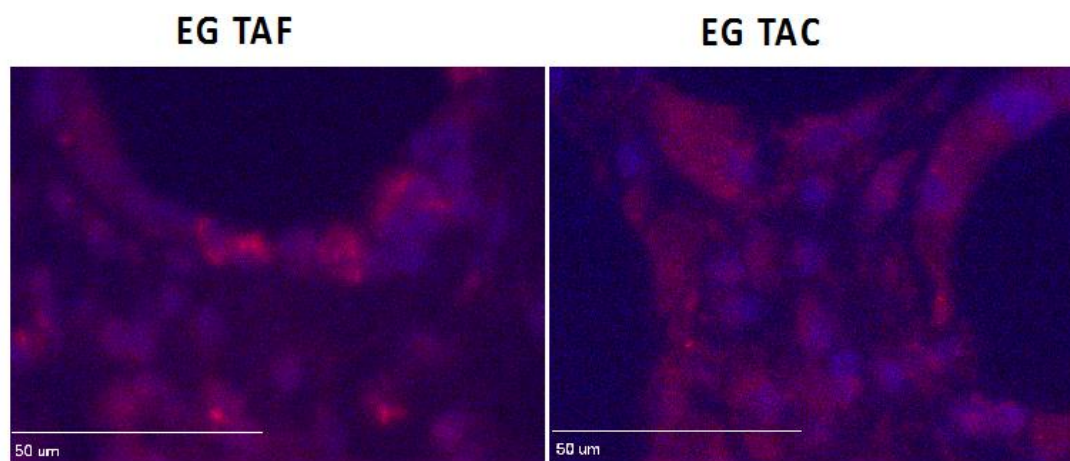


Figura 10 – Fotomicrografia representativa de imuno-histoquímica com coloração para CD31 de EG TAF (lado esquerdo) e EG TAC (lado direito).

6 DISCUSSÃO

O uso de enxerto de gordura autóloga para o tratamento de defeitos de contorno e volume em cirurgia estética e reparadora aumentou drasticamente nos últimos anos. Entretanto, as variações na técnica do procedimento, aliadas à falta de objetividade na análise dos resultados do tratamento, levam a maior desvantagem da técnica: a não previsibilidade de taxa de reabsorção, com necessidade frequente de repetição do procedimento. A obtenção de tecido adiposo humano por meio de lipoaspiração requer tempo, possui risco de morbidade e o tempo de preparo do tecido tornam-se fatores limitantes para uso repetido ou imediato (GIR *et al.*, 2012).

A criopreservação de tecido adiposo tem o potencial de permitir uma abordagem mais prática, disponibilizando tecido ou células de forma imediata ou mais rápida para reconstrução de tecidos moles ou outros usos em medicina regenerativa (CHOUDHERY *et al.*, 2014).

A descrição da presença de células precursoras no tecido adulto e, mais especificamente, a identificação de célula tronco derivada de tecido adiposo humano em 2002 por ZUK *et al.* (2002), mostrou que o tecido adiposo tem um papel funcional importante, já que estas células mantêm multipotencialidade e outras características imunológicas. O processamento do tecido adiposo produz um grupo heterogêneo de células mesenquimais chamado fração estromal vascular que inclui células endoteliais, fibroblastos, linfócitos B e T, macrófagos, pericitos, pré-adipócitos e as células tronco derivadas de tecido adiposo que proliferam quando cultivadas em meio de cultura próprio. A expansão em cultura depleta as populações hematopoiéticas, levando à proliferação de uma população mais

homogênea caracterizadas *in vitro* como células tronco derivadas do tecido adiposo (GIMBLE *et al.*, 2013).

A caracterização das células da fração estromal vascular e das células-tronco derivadas do tecido adiposo tem evoluído nos últimos anos (GAIBA *et al.*, 2012; BOURIN *et al.*, 2013), demonstrando alterações funcionais com redução da capacidade de diferenciação após longos períodos de criopreservação ou manutenção em cultura por várias passagens (GOH *et al.*, 2007). O grande valor estrutural e do nicho para a função celular do tecido adiposo, e sendo que até a presente data não foram muitos os trabalhos publicados que avaliaram de forma mais abrangente o tecido adiposo criopreservado, nos levou ao interesse de caracterizar o tecido adiposo criopreservado.

O número de doadores foi calculado com base na viabilidade das células da FEV e foi semelhante à casuística de estudos de PU *et al.* (2004), único estudo que, como o presente, comparou viabilidade dos grupos celulares de FEV de mesmos doadores. LO SURDO *et al.* (2013), utilizou células-tronco de medula óssea de oito doadores para a caracterização com UFC-F, imunofenotipagem e potencial de diferenciação adipogênica.

Lipoaspiração com técnica tumescente em frascos de coleta a vácuo foi utilizada para a obtenção do tecido a ser processado como nos estudos de PU *et al.*, 2004 e MOSCATELLO *et al.*, 2005.

Dado que o tecido adiposo retirado por lipoaspiração ou outros procedimentos estéticos é normalmente realizado em pacientes de idade não muito avançada e descartado, a criopreservação desse material para uso futuro torna-se vantajosa, já que o envelhecimento tem demonstrado diminuição na funcionalidade das células precursoras encontradas em tecidos adultos (GIMBLE *et al.*, 2008; JAMES *et al.*, 2011). No presente estudo, nenhum dos pacientes era idoso. Além disso, o índice de massa

corporal também tem sido relacionado à alteração funcional das células-tronco adultas com redução em sua capacidade de diferenciação (FRAZIER *et al.*, 2013; SILVA *et al.*, 2015; SILVA *et al.*, 2017).

As principais etapas para o processo de criopreservação de células ou de tecidos incluem a adição de agentes crioprotetores (ACP), normalmente substâncias orgânicas de baixo peso molecular que penetram nas células e impedem formação de cristais de gelo, como dimetil sulfóxido (DMSO) e glicerol, ou crioprotetores extracelulares como polivinil pirrolidona (PVP) e trealose, antes do congelamento, para evitar a formação de cristais de gelo intracitoplasmáticos ou extracelulares durante o processo (PEGG, 2015). Em seguida, o congelamento deve ser realizado numa velocidade controlada, lenta o suficiente para evitar a formação de gelo, mas suficientemente rápida para minimizar os danos celulares provocados pela baixa temperatura em que as células ou tecidos serão armazenados (THIRUMALA, GIMBLE, DEVIREDDY, 2005; THIRUMALA *et al.*, 2005). O resfriamento lento e transferência para tanque de nitrogênio líquido para posterior descongelamento em banho-maria e remoção do ACP por meio de lavagens e centrifugação foi o protocolo utilizado (CUI *et al.*, 2007; PU, 2009; YU *et al.*, 2011). Entretanto, alguns pesquisadores avaliaram a criopreservação do tecido adiposo sem agentes de criopreservação e até em temperaturas mais altas, na tentativa de elaborar um método que fosse mais facilmente transferido para o uso clínico, dado que os ACP têm toxicidade (SHOSHANI *et al.*, 2001; MACRAE *et al.*, 2004; ATIK *et al.*, 2006), reportando manutenção de viabilidade e qualidade de enxertos com métodos que poderiam não refletir de forma confiável os resultados.

Estudos *in vitro* comparando grupos sem ACP como controle a grupos com adição de diferentes ACP a mais baixas temperaturas

(nitrogênio líquido) têm resultado em maior viabilidade e manutenção da atividade metabólica das células do tecido criopreservado (MACRAE *et al.*, 2004; WOLTER *et al.*, 2005).

TAH criopreservado em DMSO 3,3%, combinado ou não com trealose 7,6% manteve viabilidade e funcionalidade, quando transplantado em camundongos imunodeficientes. Esses estudos assumiram criopreservação por 20 minutos em nitrogênio líquido como equivalente a criopreservação por longo período (PU, 2009; CUI & PU, 2010). CHAPUT *et al.* (2014) observaram melhor viabilidade (86%) com uso de DMSO 5% associado a HES 95% como ACP (não houve um grupo com apenas DMSO como ACP) para criopreservação por sete dias. Um estudo mais recente analisou criopreservação por duas semanas usando glicerol 10% como ACP e demonstrou persistência de viabilidade, potencial de aderência, diferenciação, manutenção dos marcadores celulares de superfície e persistência do enxerto de gordura *in vivo* (CONTI *et al.*, 2015).

Neste trabalho, DMSO foi escolhido como ACP, já que ainda é o agenter que melhor mantém rendimento e viabilidade celular, e é rotineiramente usado em protocolos de diferentes instituições e também para preservação de medula óssea para transplante (MOSCATELLO *et al.*, 2005; THIRUMALA, GIMBLE, DEVIREDDY, 2010b; THIRUMALA *et al.*, 2010; ROATO *et al.*, 2016). O tecido foi criopreservado em criotubos de cinco ml como descrito por CHOUDHERY *et al.* (2014). É relevante considerar o período de quatro semanas de criopreservação em nitrogênio líquido como mais próximo do período ideal para uso clínico repetido e foi considerado como criopreservação por longo período em estudos anteriores (CHAPUT *et al.*, 2014), tendo sido o período utilizado no presente estudo. Para o processamento do TAH (TAF e TAC), foi utilizado protocolo

previamente descrito (GIMBLE & GUILAK, 2003a; YU *et al.*, 2011), com digestão enzimática em solução de colagenase tipo I e também utilizado por diferentes autores (PU *et al.*, 2004; MOSCATELLO *et al.*, 2005). As células obtidas do processamento foram contadas por teste previamente descrito (KASIBHATLA *et al.*, 2006) e utilizado por MOSCATELLO *et al.* (2005), sendo considerado preciso para avaliação de produção e viabilidade celular.

BOURIN *et al.* (2013) propuseram um consenso para a caracterização de células da FEV e CTTAH. Para evitar discrepâncias devido à variabilidade individual, os três grupos de células da fração estromal vascular (FEV de tecido fresco, FEV criopreservada e FEV de tecido criopreservado) de mesmos doadores foram analisados com a hipótese de que TAH e células da FEV podem ser criopreservados com DMSO por longo período e mantidas em nitrogênio líquido sem perda substancial de viabilidade de células progenitoras, e mantendo suas características e funcionalidade.

Houve manutenção do rendimento celular do tecido criopreservado em relação ao tecido fresco em mais de 300 mil células por mililitro de tecido processado no presente trabalho. Entretanto, a viabilidade das células da FEV criopreservadas e das células obtidas do tecido criopreservado sofreram redução. O método de contagem das células da FEV foi o mesmo descrito por MOSCATELLO *et al.* (2005), sendo considerado o mais preciso, marcando em cor alaranjada as células não viáveis e em verde as células viáveis. Os resultados estão de acordo com trabalhos anteriores (PU *et al.*, 2009; THIRUMALA *et al.*, 2010; CHAPUT *et al.*, 2014). Entretanto estes trabalhos consideraram período de criopreservação de 20 minutos a uma semana enquanto no presente estudo o período de quatro semanas atingindo viabilidade de 60% para células de

tecido criopreservado e de 65% para FEV criopreservada. Nenhum dos trabalhos comparou os três grupos celulares de mesmos doadores.

A cultura das células da FEV para obtenção de CTTAH foi realizada também segundo protocolo previamente descrito (BUNNELL *et al.*, 2008). As células da FEV de TAF e TAC mantiveram seu potencial de aderência e crescimento em meio de cultura próprio, levando à obtenção de CTTAH. PU *et al.*, 2006a obteve resultados semelhantes, ainda que os autores tenham descrito um atraso na proliferação celular do grupo de células de tecido criopreservado por 20 minutos. O ensaio de UFC-F (WU *et al.*, 2000; STASZKIEWICZ *et al.*, 2010) determina a frequência de células aderentes e estima a taxa de duplicação dessa população em cultura, refletindo, portanto, o número absoluto de células progenitoras (CASTRO-MALASPINA *et al.*, 1982; BOURIN *et al.*, 2013). Estima-se que apenas 3 a 5% das células da FEV sejam aderentes (GALIPEAU *et al.*, 2016) e, portanto, um maior número de células foi cultivado, quando comparado ao mesmo ensaio para CTTAH (CASTRO-MALASPINA *et al.*, 1982).

Os resultados encontrados no presente estudo indicam a redução da capacidade de proliferação após criopreservação de células da FEV ou do tecido adiposo. Ainda que o número de células progenitoras das células da FEV criopreservadas ou obtidas de tecido criopreservado tenha reduzido, as células cultivadas de tecido fresco (CTTAH TAF) e criopreservado (CTTAH TAC) preservaram a função de duplicação, e esse achado está de acordo com estudos prévios de criopreservação de CTTAH (GOH *et al.*, 2007; THIRUMALA, GIMBLE, DEVIREDDY, 2010a; BOURIN *et al.*, 2013; MARQUEZ-CURTIS *et al.*, 2015; FRAZIER *et al.*, 2016).

A capacidade de diferenciação diminui após manutenção das CTTAH em cultura por múltiplas passagens, além do risco de contaminação da cultura, sugerindo que células de geração mais elevadas

poderiam ter seu uso limitado (DEVIREDDY *et al.*, 2007; JAMES *et al.*, 2011). A criopreservação celular por longos períodos também pode estar relacionada à redução da capacidade de diferenciação das CTTAH (JAMES *et al.*, 2011; SHAH *et al.*, 2016). Esses fatores reforçam o fato de que a preservação por longo prazo de FEV e CTTAH tem grande importância para o futuro da terapia celular (DEVIREDDY & THIRUMALA, 2011).

Os ensaios de diferenciação adipogênica e osteogênica das CTTAH refletem a multipotencialidade destas células. Estudos *in vitro* do potencial de diferenciação das CTTAH não necessariamente podem ser transferidos para aplicação *in vivo*. Ainda que outras diferenciações possam ser induzidas, como por exemplo a diferenciação condrogênica, esta se desenvolve melhor em culturas tridimensionais, neurogênica entre outras e não foi objetivo deste trabalho (GIMBLE *et al.*, 2008; CONTI *et al.*, 2015).

A identificação e avaliação quantitativa funcional foi feita por análise bioquímica (histoquímica com colorações de *Oil Red O* para diferenciação adipogênica e vermelho de alizarina para diferenciação osteogênica detectadas por leitura de absorbância em espectrofotômetro) ou por transcrição reversa por rt-PCR com detecção de amplificação da expressão de genes relacionados a adipogênese (CEBP α , PPAR γ , UCP1, leptina, adiponectina) e osteogênese (fosfatase alcalina, RUNX2, osteopontina, osteocalcina) (ROGERS *et al.*, 2008; BOURIN *et al.*, 2013; PIRES DE CARVALHO *et al.*, 2014; SHAH *et al.*, 2016; ROATO *et al.*, 2016).

As amostras induzidas à diferenciação foram significativamente positivas em relação as amostras não induzidas. A criopreservação de tecido não afetou o potencial de diferenciação adipogênico e osteogênico das CTTAH, quando comparadas às de tecido fresco, demonstrando amplificação semelhante de expressão dos genes pesquisados. Estes

resultados estão em concordância com trabalhos de CHOUDHERY *et al.* (2014), que também usou protocolo de criopreservação por uma semana com DMSO e de CONTI *et al.* (2015), que avaliaram diferenciação adipogênica e osteogênica após criopreservação por duas semanas em glicerol 10% como ACP. Nesse sentido, o tecido criopreservado poderia se tornar uma fonte adicional de células.

Como não há um marcador celular de superfície que identifique a FEV, um painel com múltiplos anticorpos contra antígenos de superfície com diferentes cores de fluorocromos foi utilizado para caracterizar diferentes populações celulares da FEV (DOMINICI *et al.*, 2006; ZIMMERLIN *et al.*, 2010; PACHÓN-PEÑA *et al.*, 2011; TUCKER & BUNNELL, 2011). As células da FEV foram identificadas fenotipicamente pelos seguintes marcadores: CD73 (marcador estromal), CD36 (marcador de adipócitos), CD34 (marcador de células precursoras), CD146 (marcador mesenquimal), CD45 (marcador hematopoiético), CD31 (marcador vascular), CD3 (marcador de linfócitos B) e CD19 (marcador de linfócitos T).

Os painéis dos oito doadores foram comparáveis e consistentes com estudos prévios que avaliaram antígenos de superfície da FEV (THIRUMALA, GIMBLE, DEVIREDDY, 2010a; PACHÓN-PEÑA *et al.*, 2011; BOURIN *et al.*, 2013). A criopreservação de célula e/ou tecido trouxe incremento da expressão de marcadores celulares de adipócito (CD36), estromal (CD73), mesenquimal (CD146) e progenitor endotelial (CD34) e reduziu marcador hematopoiético (CD45).

Trabalhos anteriores reportaram que CD34 é um marcador que pode indicar a maior tendência à retenção de volume em enxertos de gordura e também maior capacidade de diferenciação adipogênica, sugerindo que talvez, futuramente, medidas de marcadores específicos possam ser

correlacionadas com a funcionalidade do TAH para uso clínico (SUGA *et al.*, 2009; PHILIPS *et al.*, 2013). Além disso, a redução nos marcadores hematopoiéticos e incremento dos marcadores de células estromais associadas a efeitos imunomodulatórios e de liberação de citocinas poderiam também sugerir uma consequência benéfica da criopreservação (SUGA *et al.*, 2009). Para aplicação clínica futura, a criopreservação de células da FEV, ou mesmo de TAH, poderão provar efeitos benéficos consequentes à criopreservação (PHILIPS *et al.*, 2013).

Em cultura, CTTAH mantém marcadores em comum com outras células-tronco mesenquimais, incluindo CD90 (marcador de células-tronco), CD73 (marcador de células mesenquimais) e CD105 (marcador de células-tronco), permanecendo negativas para CD45 (marcador hematopoiético) e CD 34 (marcador de células precursoras endoteliais) (DOMINICI *et al.*, 2006; TUCKER & BUNNELL, 2011). A distinção entre CTTAH e célula-tronco de medula óssea se dá pela positividade para CD36 e negatividade para CD106 (BOURIN *et al.*, 2013).

Neste estudo, não houve alteração na expressão dos marcadores celulares de superfície das células cultivadas demonstrando a persistência dessa característica após a criopreservação de tecido em relação às de tecido fresco, em concordância com trabalho que utilizou painel semelhante (ROATO *et al.*, 2016). Dado que a manutenção das células em cultura ou mesmo em criopreservação por longo período pode afetar a expressão dos marcadores, a criopreservação de tecidos torna-se uma alternativa válida (DEVIREDDY, THIRUMALA, GIMBLE, 2005).

Caracterização adicional do tecido adiposo criopreservado foi feita *in vivo*. Enquanto alguns estudos utilizaram camundongos imunodeficientes como modelo animal para avaliar a retenção do volume do enxerto de tecido adiposo (ATASHROO *et al.*, 2015), outros iniciaram o uso de

animais imunocompetentes (THANIK *et al.*, 2009; SULTAN *et al.*, 2011; ZHAO *et al.*, 2012; DAVIS *et al.*, 2014; GILLIS *et al.*, 2015). Modelo animal com camundongos C57BL para avaliação de enxerto de gordura já foi descrito anteriormente com tecido autólogo (GILLIS *et al.*, 2015), entretanto trabalhos recentes usaram xenoenxerto de TAH em camundongos imunocompetentes (BUTALA *et al.*, 2012; GILLIS *et al.*, 2015).

O uso de tecido humano em camundongos imunocompetentes transgênicos que expressam PVF permitiram melhor delineamento da participação de células do doador e do receptor em nível celular, para melhor entendimento da retenção do volume do enxerto e focando na participação do receptor na manutenção do volume do xenoenxerto e sua função como um arcabouço estrutural (THANIK *et al.*, 2009).

O presente estudo usou 18 camundongos com duas áreas de enxerto de TAF ou TAC totalizando 18 amostras para cada grupo. Não houve perdas durante o estudo. O tamanho da amostra para os experimentos *in vivo* esta de acordo com trabalhos anteriores (PU *et al.*, 2006; CHAPUT *et al.*, 2014; CONTI *et al.*, 2015) e foi autorizado pelo comitê de ética em uso de animais da Tulane University.

O volume de 0,25 ml injetado com microcânula na área dorsal dos camundongos permitiu integração do tecido e facilidade de abordagem, sem incrementar o risco de rejeição. Alguma migração da área original de injeção observada em alguns casos pode ser justificada pelo excesso de mobilidade sem limites estruturais pela ausência de tecido adiposo subcutâneo no *panniculus carnosus* leva a uma importante diferença com o uso clínico, em que o tecido adiposo serve como um suporte estrutural (THANIK *et al.*, 2009). CHAPUT *et al.* (2014) e CONTI *et al.* (2015) usaram também a região dorsal como áreas receptoras para os enxertos.

Ainda com essas limitações, o modelo animal usado demonstrou resultados constantes e reprodutíveis com tecido viável.

As nove semanas como tempo para remoção dos enxertos foi considerada, em trabalhos anteriores, como suficiente para avaliar a persistência de EG com equilíbrio da reabsorção e desenvolvimento completo de vascularização (THANIK *et al.*, 2009; SULTAN *et al.*, 2011). O peso dos enxertos de tecido criopreservados foi menor que os de tecido fresco, de acordo com PU *et al.* (2006) (período de criopreservação de tecido foi de 20 minutos e remoção dos enxertos de camundongos *nude* após 16 semanas) e CHAPUT *et al.* (2014) (criopreservação por quatro semanas e remoção dos enxertos de camundongos *nude* após seis semanas).

A histologia foi usada para avaliar o aspecto do tecido permitindo quantificar infiltrado celular e fibrose (SULTAN *et al.*, 2011; ZHANG, DIETRICH, LOPEZ, 2014; CHAPUT *et al.*, 2014) e mostrou preservação da arquitetura do tecido adiposo criopreservado, quando comparado ao enxerto fresco, com evidenciação de manutenção da estrutura, infiltrado celular, algumas áreas de fibrose e discreta formação de cápsula. CHAPUT *et al.* (2014) mostraram aumento da celularidade e maior fibrose nos enxertos criopreservados em modelo experimental com camundongos *nude*.

A detecção da presença de células positivas para PVF por microscopia confocal permitiu a identificação de células positivas, do receptor, em áreas mais periféricas dos fragmentos dos enxertos de tecido adiposo humano (DOI *et al.*, 2015). Esses achados foram corroborados por imuno-histoquímica, que permitiu a identificação de infiltrado celular do receptor em áreas mais periféricas dos tecidos enxertados, fresco ou criopreservado.

Ainda que alguns estudos utilizaram apenas H&E para a avaliação da presença de adipócitos viáveis (PU *et al.*, 2009; LI *et al.*, 2012), a coloração para perilipina identifica a presença de adipócitos funcionais. No presente estudo, esse método evidenciou células positivas em ambos grupos em toda extensão dos enxertos retirados após nove semanas de implantação com persistência do tecido humano no modelo experimental, em concordância com trabalhos anteriores (CONTI *et al.*, 2005; DONG *et al.*, 2015).

A evidenciação da vascularização do tecido enxertado por meio de coloração com CD31, como usado em trabalho de SULTAN *et al.* (2011), tanto para TAF como TAC, demonstrou integração e funcionalidade do tecido transplantado.

O presente estudo caracterizou a criopreservação por longo período de células da FEV e TAH, demonstrando a persistência de alta produção de células da FEV pelo processamento do tecido, viabilidade das células da FEV e manutenção de sua função, incremento de expressão de marcadores celulares de superfície estromal e adipogênico, redução dos marcadores hematopoiéticos, manutenção das características das CTTAH e seu potencial de diferenciação, além de persistência *in vivo* dos enxertos de gordura.

Esses achados levam a futuras perspectivas para pesquisa e translação clínica. Ainda é incerto se períodos mais prolongados com diferentes ACP menos tóxicos e sem a presença de proteínas xenofóbicas, em distintas temperaturas que fossem mais práticas, sem depender de um banco de tecidos ou da aquisição de um congelador de -80°C ou um tanque de nitrogênio líquido, seriam suficientes para promover os mesmos resultados. A investigação da participação de células precursoras na integração do enxerto, antes ou após criopreservação, levando em

consideração a depleção de marcadores hematopoiéticos após criopreservação, poderia demonstrar outra vantagem da técnica. Além disso, é necessária investigação quanto ao potencial estrutural do tecido adiposo como um arcabouço que permita o repovoamento de sua matriz com células locais, no qual serão expostos a fatores locais.

7 CONCLUSÃO

7. Conclusão

Tecido adiposo humano criopreservado mantém rendimento e viabilidade celular, aumenta marcadores celulares de superfície precursores estromais de células de fração estromal vascular, mantém características das células-tronco derivadas do tecido adiposo humano *in vitro* e características do enxerto de gordura *in vivo* em camundongos.

8 REFERÊNCIAS

Almeida MM, Caires LCJ, Musso CM, Campos JMS, Maranduba CMC, Macedo GC, Mendonça JPRF, Garcia RMG. Protocol to cryopreserve and isolate nuclei from adipose tissue without dimethyl sulfoxide. *Genet Mol Res.* 2014 Dec;13(4):10921-33.

Atashroo DA, Paik KJ, Chung MT, McArdle A, Senarath-Yapa K, Zielins Elizabeth R., Tevlin R, Duldulao CR., Walmsley GG., Weara T, Marecic O, Longaker MT, Wan DC. Assessment of viability of human fat injection into nude mice with micro-computed tomography. *J Vis Exp* 2015 Jan.; (95):e52217.

Atik B, Oztürk G, Erdoğan E, Tan O. Comparison of techniques for long-term storage of fat grafts: an experimental study. *Plast Reconstr Surg.* 2006 Dec;118(7):1533-7.

Bae YC, Song JS, Bae SH, Kim JH. Effects of human adipose-derived stem cells and stromal vascular fraction on cryopreserved fat transfer. *Dermatol Surg.* 2015 May;41(5):605-14.

Bogdanova A, Berzins U, Nikulshin S, Skrastina D, Ezerta A, Legzdina D, Kozlovska T. Characterization of human adipose-derived stem cells cultured in autologous serum after subsequent passaging and long term cryopreservation. *J Stem Cells.* 2014;9(3):135-48.

Bourin P, Bunnell BA, Casteilla L, Dominici M, Katz AJ, March KL, Redl H, Rubin JP, Yoshimura K, Gimble JM. Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the International Society for Cellular Therapy (ISCT). *Cytotherapy*. 2013 Jun;15(6): 641-8.

Buehrer BM, Cheatham B. Isolation and characterization of human adipose-derived stem cells for use in tissue engineering. In: Basu J, Ludlow, JW, editors. *Organ regeneration: methods and protocols*. New York: Humana Press; Springer; 2013. p. 1-11. (Methods in Molecular Biology, 1001).

Bunnell BA, Flaat M, Gagliardi C, Patel B, Ripoll C. Adipose-derived stem cells: isolation, expansion and differentiation. *Methods*. 2008 Jun;45(2):115-20.

Butala P, Hazen A, Szpalski C, Sultan SM, Coleman SR, Warren SM. Endogenous stem cell therapy enhances fat graft survival. *Plast Reconstr Surg*. 2012 Aug;130(2):293-306.

Caplan, AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res*, 1991 Sep;9(5):641-50.

Caspar-Bauguil S, Cousin B, Bour S, Casteilla L, Penicaud L, Carpené C. Adipose tissue lymphocytes: types and roles. *J Physiol Biochem*. 2009 Dec;65(4):423-36.

-
- Castro-Malaspina H, Gay RE, Jhanwar SC, Hamilton JA, Chiarieri DR, Meyers PA, Gay S, Moore MA. Characteristics of bone marrow fibroblast colony-forming cells (CFU-F) and their progeny in patients with myeloproliferative disorders. *Blood*. 1982 May;59(5):1046-54.
- Chaput B, Orio J, Garrido I, De Bonnecaze G, Espagnol N, Gadelorge M, Chavoïn JP, Grolleau-Raoux JL, Casteilla L, Planat V, Bourin P. A clinical scalable cryopreservation method of adipose tissue for reconstructive surgery assessed by stromal vascular fraction and mice studies. *Plast Reconstr Surg*. 2014 Apr;133(4):815-26.
- Choi M, Small K, Levovitz C, Lee C, Fadl A, Karp NS. The volumetric analysis of fat graft survival in breast reconstruction. *Plast Reconstr Surg*. 2013 Feb;131(2):185-91.
- Choudhery MS, Badowski M, Muise A, Pierce J, Harris DT. Cryopreservation of whole adipose tissue for future use in regenerative medicine. *J Surg Res*. 2014 Mar;187(1):24-35.
- Coleman SR. Structural fat grafts: the ideal filler? *Clin Plast Surg*. 2001 Jan;28(1):111-9.
- Coleman SR. Hand rejuvenation with structural fat grafting. *Plast Reconstr Surg*. 2002 Dec;110(7):1731-44.
- Coleman SR. Facial augmentation with structural fat grafting. *Clin Plast Surg*. 2006a Oct;33(4):567-77.

Coleman SR. Structural fat grafting: more than a permanent filler. *Plast Reconstr Surg*. 2006b Sep;118(3 Suppl):108S-120S.

Coleman SR, Saboeiro, AP. Fat grafting to the breast revisited: safety and efficacy. *Plast Reconstr Surg*. 2007 Mar;119(3):775-85.

Conti G, Jurga M, Benati D, Bernardi P, Mosconi E, Rigotti G, Buvé M, Van Wemmel K, Sbarbati A. Cryopreserved subcutaneous adipose tissue for fat graft. *Aesthetic Plast Surg*. 2015 Oct;39(5):800-17.

Cosmetic Surgery National Data Bank Statistics. *Aesthet Surg J*. 2016 Apr;36(Suppl 1):1-29.

Cousin B, André M, Arnaud E, Pénicaud L, Casteilla L. Reconstitution of lethally irradiated mice by cells isolated from adipose tissue. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003 Feb;301(4):1016-22.

Cui X, Pu LL. The search for a useful method for the optimal cryopreservation of adipose aspirates: part I. In vitro study. *Aesthet Surg J*. 2009 May-Jun;29(3):248-52.

Cui X, Pu LL. The search for a useful method for the optimal cryopreservation of adipose aspirates: part II. In vivo study. *Aesthet Surg J*. 2010 May-Jun;30(3):451-6.

Cui XD, Gao DY, Fink BF, Vasconez HC, Pu LL. Cryopreservation of human adipose tissues. *Cryobiology*. 2007 Dec;55(3):269-78.

D'Amico RA, Rubin JP, Neumeister MW, Del Vecchio DA, Cederna PS, Seward W, Shoaf L. A report of the ASPS task force on regenerative medicine: opportunities for plastic surgery. *Plast Reconstr Surg*. 2013 Feb;131(2):393-9.

Davies OG, Smith AJ, Cooper PR, Shelton RM, Scheven BA. The effects of cryopreservation on cells isolated from adipose, bone marrow and dental pulp tissues. *Cryobiology*. 2014 Oct;69(2):342-7.

Davis TA, Anam K, Lazdun Y, Gimble JM, Elster EA. Adipose-derived stromal cells promote allograft tolerance induction. *Stem Cells Transl Med*, 2014 Dec.;3(12):1444-50.

Deng Y, Liu S, Xie H, Tang F, Li M, Chen N. Effect of trehalose on survival rate for fat cells after cryopreservation. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*. 2017 May 28;42(5):507-10.

Dennis JE, Haynesworth SE, Young RG, Caplan AI. Osteogenesis in marrow-derived mesenchymal cell porous ceramic composites transplanted subcutaneously: effect of fibronectin and laminin on cell retention and rate of osteogenic expression. *Cell Transplant*. 1992;1(1):23-32.

Devireddy R, Thirumala S. Preservation protocols for human adipose tissue-derived adult stem cells. In: Gimble, Jeffrey M., Bunnell, Bruce A, editors. *Adipose-Derived Stem Cells: methods and protocols*. New York: Humana Press; Springer; 2011. Chapter 27, p. 369-94. (Methods in Molecular Biology, 702).

-
- Devireddy RV, Thirumala S, Gimble JM. Cellular response of adipose derived passage-4 adult stem cells to freezing stress. *J Biomech Eng.* 2005 Dec;127(7):1081-6.
- Devitt SM, Carter CM, Dierov R, Weiss S, Gersch RP, Percec I. Successful isolation of viable adipose-derived stem cells from human adipose tissue subject to long-term cryopreservation: positive implications for adult stem cell-based therapeutics in patients of advanced age. *Stem Cells Int.* 2015;2015:146421.
- Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop Dj, Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2006;8(4):315-7.
- Eaves FF, Haeck PC, Rohrich RJ. ASAPS/ASPS Position statement on stem cells and fat grafting. *Plast Reconstr Surg.* 2012 Jan;129(1):285-7.
- Erol OO, Agaoglu G. Facial rejuvenation with staged injections of cryopreserved fat and tissue cocktail: clinical outcomes in the past 10 years. *Aesthet Surg J.* 2013 Jul;33(5):639-53.
- Eto H, Suga H, Inoue K, Aoi N, Kato H, Araki J, Doi K, Higashino T, Yoshimura K. Adipose injury-associated factors mitigate hypoxia in ischemic tissues through activation of adipose-derived stem/progenitor/stromal cells and induction of angiogenesis. *Am J Pathol.* 2011 May;178(5):2322-32.

Frazier TP, Bowles A, Lee S, Abbott R, Tucker HA, Kaplan D, Wang M, Strong A, Brown Q, He J, Bunnell B, Gimble JM. Serially transplanted nonpericytic CD146 adipose stromal/stem cells in silk bioscaffolds regenerate adipose tissue in vivo. *Stem Cells*. 2016;34(4):1097-111.

Frazier TP, Gimble JM, Devay JW, Tucker HA, Chiu ES, Rowan BG. Body mass index affects proliferation and osteogenic differentiation of human subcutaneous adipose tissue-derived stem cells. *BMC Cell Biol*. 2013 Aug 7;14:34.

Friedenstein AJ. Precursor cells of mechanocytes. *Int Rev Cytol*. 1976;47:327-59.

Friedenstein AJ, Petrakova KV, Kurolesova AI, Frolova GP. Heterotopic transplants of bone marrow: analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation*. 1968 Mar;6(2):230-47.

Gaiba S, França LP, França JP, Ferreira LM. Characterization of human adipose-derived stem cells. *Acta Cir Bras*. 2012 Jul;27(7):471-6.

Galipeau J, Krampera M, Barrett J, Dazzi F, Deans RJ, DeBruijn J, Dominici M, Fibbe WE, Gee AP, Gimble JM, Hematti P, Koh MB, LeBlanc K, Martin I, McNiece IK, Mendicino M, Oh S, Ortiz L, Phinney DG, Planat V, Shi Y, Stroncek DF, Viswanathan S, Weiss DJ, Sensebe L. International Society for Cellular Therapy perspective on immune functional assays for mesenchymal stromal cells as potency release criterion for advanced phase clinical trials. *Cytotherapy*. 2016 Feb;18(2):151-9.

Gillis J, Gebremeskel S, Phipps KD, MacNeil LA, Sinal CJ, Johnston B, Hong P, Bezuhly M. Effect of n-acetylcysteine on adipose-derived stem cell and autologous fat graft survival in a mouse model. *Plast Reconstr Surg*. 2015 Aug;136(2):179e-88e.

Gimble JM, Bunnell BA, Chiu ES, Guilak F. Concise review: adipose-derived stromal vascular fraction cells and stem cells: let's not get lost in translation. *Stem Cells*. 2011 May;29(5):749-54.

Gimble JM, Bunnell BA, Frazier T, Rowan B, Shah F, Thomas-Porch C, Wu XF. Adipose-derived stromal/stem cells: a primer. *Organogenesis*. 2013;9(1):3-10.

Gimble JM, Guilak F. Adipose-derived adult stem cells: isolation, characterization, and differentiation potential. *Cytherapy*. 2003a Jan;5(5):362-369.

Gimble JM, Guilak F. Differentiation potential of adipose derived adult stem (ADAS) cells. *Curr Top Dev Biol*. 2003b;58:137-60.

Gimble J M, Guilak F, Bunnell BA. Clinical and preclinical translation of cell-based therapies using adipose tissue-derived cells. *Stem Cell Res Ther*. 2010 Jun;29;1(2):19.

Gimble JM, Guilak F, Nuttall ME, Sathishkumar S, Vidal M, Bunnell BA. In vitro differentiation potential of mesenchymal stem cells. *Transfus Med and Hemother*. 2008 Jun;35(3):228-38.

-
- Gir P, Brown SA, Oni G, Kashefi N, Mojallal A, Rohrich RJ. Fat grafting: evidence-based review on autologous fat harvesting, processing, reinjection, and storage. *Plast Reconstr Surg*. 2012 Jul;130(1):249-58.
- Goh BC, Thirumala S, Kilroy G, Devireddy RV, Gimble JM. Cryopreservation characteristics of adipose-derived stem cells: maintenance of differentiation potential and viability. *J Tissue Eng Regen Med*. 2007 Jul-Aug;1(4):322-4.
- González MA, Gonzalez-Rey E, Rico L, Büscher D, Delgado M. Adipose-derived mesenchymal stem cells alleviate experimental colitis by inhibiting inflammatory and autoimmune responses. *Gastroenterology*. 2009 Mar;136(3):978-89.
- Gronthos S, Franklin DM, Leddy HA, Robey PG, Storms RW, Gimble JM. Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells. *J Cell Physiol*. 2001 Oct;189(1):54-63.
- Guilak F, Lott KE, Awad HA, Cao Q, Hicok KC, Fermor B, Gimble JM. Clonal analysis of the differentiation potential of human adipose-derived adult stem cells. *J Cell Physiol*. 2006 Jan;206(1):229-37.
- Han J, Koh YJ, Moon HR, Ryoo HG, Cho CH, Kim I, Koh GY. Adipose tissue is an extramedullary reservoir for functional hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood*. 2010 Feb;115(5):957-64.

Haynesworth SE, Baber MA, Caplan AI. Cell surface antigens on human marrow-derived mesenchymal cells are detected by monoclonal antibodies. *Bone*. 1992;13(1):69-80.

Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Deans RJ, Krause DS, Keating A. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2005 Feb;7(5):393-5.

James AW, Levi B, Nelson ER, Peng M, Commons GW, Lee M, Wu B, Longaker MT. Deleterious effects of freezing on osteogenic differentiation of human adipose-derived stromal cells in vitro and in vivo. *Stem Cells Dev*. 2011 Mar; 20(3):427-39.

Jang TH, Park SC, Yang JH, Kim JY, Seok JH, Park US, Choi CW, Lee SR, Han J. Cryopreservation and its clinical applications. *Integr Med Res*. 2017 Mar;6(1):12-18.

Jenkins DD, Yang GP, Lorenz HP, Longaker MT, Sylvester KG. Tissue engineering and regenerative medicine. *Clin Plast Surg*. 2003 Oct;30(4):581-8.

Jeon IK, Lee H, Shin JY, Oh SH. Cryopreserved autologous fat injections as a filler agent for facial augmentation: are they still safe? *Yonsei Med J*. 2014 Jan; 55(1): 280-81.

-
- Kang JW, Kang KS, Koo HC, Park JR, Choi EW, Park YH. Soluble factors-mediated immunomodulatory effects of canine adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev.* 2008 Aug;17(4):681-93.
- Kasibhatla S, Amarante-Mendes GP, Finucane D, Brunner T, Bossy-Wetzel E, Green DR. Acridine orange/ethidium bromide (AO/EB) staining to detect apoptosis. *CSH Protoc.* 2006 Aug;2006(3).
- Kim WS, Park BS, Kim HK, Park JS, Kim KJ, Choi JS, Chung SJ, Kim DD, Sung JH. Evidence supporting antioxidant action of adipose-derived stem cells: Protection of human dermal fibroblasts from oxidative stress. *J Dermatol Sci.* 2008 Feb;49(2):133-42.
- Kim WS, Park BS, Sung JH, Yang JM, Park SB, Kwak SJ, Park JS. Wound healing effect of adipose-derived stem cells: a critical role of secretory factors on human dermal fibroblasts. *J Dermatol Sci.* 2007 Oct;48(1):15-24.
- Ko MS, Jung JY, Shin IS, Choi EW, Kim JH, Kang SK, Ra JC. Effects of expanded human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells on the viability of cryopreserved fat grafts in the nude mouse. *Int J Med Sci.* 2011 Mar; 8(3): 231-8.
- Li BW, Liao WC, Wu SH, Ma H. Cryopreservation of fat tissue and application in autologous fat graft: in vitro and in vivo study. *Aesthetic Plast Surg.* 2012 Jun;36(3):714-22.

Lo Surdo J, Millis B, Bauer SR. Automated microscopy as quantitative method to measure differences in adipogenic differentiation in preparations of human mesenchymal stem cells. *Cytotherapy*. 2013 Dez; 15(12):1527-40.

MacRae JW, Tholpady SS, Ogle RC, Morgan RF. Ex vivo fat graft preservation: effects and implications of cryopreservation. *Ann Plast Surg*. 2004 Mar;52(3):281-2.

Marquez-Curtis LA, Janowska-Wieczorek A, McGann LE, Elliott JA. Mesenchymal stromal cells derived from various tissues: biological, clinical and cryopreservation aspects. *Cryobiology*. 2015 Oct;71(2):181-97.

McIntosh K, Zvonic S, Garrett S, Mitchell JB, Floyd ZE, Hammill L, Kloster A, Di Halvorsen Y, Ting JP, Storms RW, Goh B, Kilroy G, Wu X, Gimble JM. The immunogenicity of human adipose-derived cells: temporal changes in vitro. *Stem Cells*. 2006 May;24(5):1246-53.

McIntosh KR, Frazier T, Rowan BG, Gimble JM. Evolution and future prospects of adipose-derived immunomodulatory cell therapeutics. *Expert Rev Clin Immunol* 2013 Feb;9(2):175-84.

Mitchell JB, McIntosh K, Zvonic S, Garrett S, Floyd ZE, Kloster A, Di Halvorsen Y, Storms RW, Goh B, Kilroy G, Wu X, Gimble JM. Immunophenotype of human adipose-derived cells: temporal changes in stromal-associated and stem cell-associated markers. *Stem Cells*. 2006 Feb;24(2):376-85.

Moon MH, Kim SY, Kim YJ, Kim SJ, Lee JB, Bae YC, Sung SM, Jung JS. Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells improve postnatal neovascularization in a mouse model of hindlimb ischemia. *Cell Physiol Biochem*. 2006;17(5-6):279-90.

Moscatello DK, Dougherty M, Narins RS, Lawrence N. Cryopreservation of human fat for soft tissue augmentation: viability requires use of cryoprotectant and controlled freezing and storage. *Dermatol Surg*. 2005 Nov;31(11 Pt 2):1506-10.

Nakagami H, Maeda K, Morishita R, Iguchi S, Nishikawa T, Takami Y, Kikuchi Y, Saito Y, Tamai K, Ogihara T, Kaneda Y. Novel autologous cell therapy in ischemic limb disease through growth factor secretion by cultured adipose tissue-derived stromal cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005 Dec;25(12):2542-7.

Nauta AC, Gurtner GC, Longaker MT. Adult stem cells in small animal wound healing models. *Methods Mol Biol*. 2013;1037:81-98.

Neels JG, Thinnes T, Loskutoff DJ. Angiogenesis in an in vivo model of adipose tissue development. *FASEB J*. 2004 Jun;18(9):983-5.

Owen M. Marrow stromal stem cells. *J Cell Sci Suppl*. 1988;10:63-76.

Owen M, Friedenstein AJ. Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors. *Ciba Found Symp*. 1988;136:42-60.

Pachón-Peña G, Yu G, Tucker A, Wu X, Vendrell J, Bunnell BA, Gimble JM. Stromal stem cells from adipose tissue and bone marrow of age-matched female donors display distinct immunophenotypic profiles. *J Cell Physiol.* 2011 Mar;226(3):843-51.

Pegg DE. The history and principles of cryopreservation. *Semin Reprod Med.* 2002 Feb;20(1):5-13.

Pegg DE. Principles of cryopreservation. In: Wolkers WF, Oldenhof H, editors. *Cryopreservation and freeze-drying protocols*. 3rd ed. New York: Springer; 2015. Part I, p 3-19. (Methods in Molecular Biology, 1257).

Philips BJ, Grahovac TL, Valentin JE, Chung CW, Bliley JM, Pfeifer ME, Roy SB, Dreifuss S, Kelmendi-Doko A, Kling RE, Ravuri SK, Marra KG, Donnenberg VS, Donnenberg AD, Rubin JP. Prevalence of endogenous CD34+ adipose stem cells predicts human fat graft retention in a xenograft model. *Plast Reconstr Surg.* 2013 Oct;132(4):845-58.

Pires de Carvalho P, Hamel KM, Duarte R, King AG, Haque M, Dietrich MA, Wu X, Shah F, Burk D, Reis RL, Rood J, Zhang P, Lopez M, Gimble JM, Dasa V. Comparison of infrapatellar and subcutaneous adipose tissue stromal vascular fraction and stromal/stem cells in osteoarthritic subjects. *J Tissue Eng Regen Med.* 2014 Oct;8(10):757-62.

Poglio S, De Toni-Costes F, Arnaud E, Laharrague P, Espinosa E, Casteilla L, Cousin B. Adipose tissue as a dedicated reservoir of functional mast cell progenitors. *Stem Cells.* 2010 Nov;28(11):2065-72.

Pu LL. Cryopreservation of adipose tissue. *Organogenesis*. 2009 Jul-Sep;5(3):138-42.

Pu LL, Cui X, Fink BF, Cibull ML, Gao D. Long-term preservation of adipose aspirates after conventional lipoplasty. *Aesthet Surg J*. 2004 Nov-Dec;24(6):536-41.

Pu LL, Cui X, Fink BF, Cibull ML, Gao D. Cryopreservation of adipose tissues: the role of trehalose. *Aesthet Surg J*, 2005 Mar-Apr;25(2):126-31.

Pu LL, Cui X, Fink BF, Gao D, Vasconez HC. Adipose aspirates as a source for human processed lipoaspirate cells after optimal cryopreservation. *Plast Reconstr Surg*, 2006a May;117(6):1845-50.

Pu LL, Cui X, Li J, Fink BF, Cibull ML, Gao D. The fate of cryopreserved adipose aspirates after in vivo transplantation. *Aesthet Surg J*. 2006b Nov-Dec;26(6):653-61.

Pu LL, Yoshimura K, Coleman SR. Fat grafting: current concept, clinical application, and regenerative potential, part 1. *Clin Plast Surg*. 2015 Apr;42(2):ix-x.

Rehman J, Traktuev D, Li J, Merfeld-Clauss S, Temm-Grove CJ, Bovenkerk JE, Pell CL, Johnstone BH, Considine RV, March KL. Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. *Circulation*. 2004 Mar;109(10):1292-8.

Roato I, Alotto D, Belisario DC, Casarin S, Fumagalli M, Cambieri I, Piana R, Stella M, Ferracini R, Castagnoli C. Adipose derived-mesenchymal stem cells viability and differentiating features for orthopaedic reparative applications: banking of adipose tissue. *Stem Cells Int.* 2016;4968724.

Rogers PM, Fusinski KA, Rathod M, Loiler SA, Pasarica M, Shaw MK, Kilroy G, Sutton GM, McAllister EJ, Mashtalir N, Gimble JM, Holland TC, Dhurandhar N. Human adenovirus Ad-36 induces adipogenesis via its E4 orf-1 gene. *Int J Obes (Lond).* 2008 Mar;32(3):397-406.

Shah FS, Li J, Zanata F, Curley JL, Martin EC, Wu X, Dietrich M, Devireddy RV, Wade JW, Gimble JM. The relative functionality of freshly isolated and cryopreserved human adipose-derived stromal/stem cells. *Cells Tissues Organs.* 2016;201:436-44.

Shah FS, Wu X, Dietrich M, Rood J, Gimble JM. A non-enzymatic method for isolating human adipose tissue-derived stromal stem cells. *Cytherapy.* 2013 Aug;15(8):979-85.

Shoshani O, Ullmann Y, Shupak A, Ramon Y, Gilhar A, Kehat I, Peled IJ. The role of frozen storage in preserving adipose tissue obtained by suction-assisted lipectomy for repeated fat injection procedures. *Dermatol Surg.* 2001 Jul;27(7):645-7.

Silva KR, Côrtes I, Liechocki S, Carneiro JRI, Souza AAP, Borojevic R, Maya-Monteiro CM, Baptista LS. Characterization of stromal vascular fraction and adipose stem cells from subcutaneous, preperitoneal and visceral morbidly obese human adipose tissue depots. *PLoS One.* 2017 Mar 21;12(3):e0174115.

Silva KR, Liechocki S, Carneiro JRI, Claudio-da-Silva C, Maya-Monteiro CM, Borojevic R, Baptista LS. Stromal-vascular fraction content and adipose stem cell behavior are altered in morbid obese and post bariatric surgery ex-obese women. *Stem Cell Res Ther.* 2015 Apr;14;6:72.

Staszkievicz J, Frazier TP, Rowan BG, Bunnell BA, Chiu ES, Gimble JM, Gawronska-Kozak B. Cell growth characteristics, differentiation frequency, and immunophenotype of adult ear mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev.* 2010 Jan;19(1):83-92.

Suga H, Matsumoto D, Eto H, Inoue K, Aoi N, Kato H, Araki J, Yoshimura K. Functional implications of CD34 expression in human adipose-derived stem/progenitor cells. *Stem Cells Dev.* 2009 Oct;18(8):1201-10.

Sultan SM, Stern CS, Allen RJ Jr, Thanik VD, Chang CC, Nguyen PD, Canizares O, Szpalski C, Saadeh PB, Warren SM, Coleman SR, Hazen A. Human fat grafting alleviates radiation skin damage in a murine model. *Plast Reconstr Surg.* 2011 Aug;128(2):363-72.

Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell.* 2007 Nov;131(5):861-72.

Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell.* 2006 Aug;126(4):663-76.

Thanik VD, Chang CC, Lerman OZ, Allen RJ Jr, Nguyen PD, Saadeh PB, Warren SM, Levine JP, Coleman SR, Hazen A. A murine model for studying diffusely injected human fat. *Plast Reconstr Surg*. 2009 Jul;124(1):74-81.

Thirumala S, Gimble JM, Devireddy RV. Transport phenomena during freezing of adipose tissue derived adult stem cells. *Biotechnol Bioeng*. 2005 Nov;92(3):372-83.

Thirumala S, Gimble JM, Devireddy RV. Cryopreservation of stromal vascular fraction of adipose tissue in a serum-free freezing medium. *J Tissue Eng Regen Med*. 2010a Mar;4(3):224-32.

Thirumala S, Gimble JM, Devireddy RV. Evaluation of methylcellulose and dimethyl sulfoxide as the cryoprotectants in a serum-free freezing media for cryopreservation of adipose-derived adult stem cells. *Stem Cells Dev*. 2010b Apr;19(4):513-22.

Thirumala S, Wu X, Gimble JM, Devireddy RV. Evaluation of polyvinylpyrrolidone as a cryoprotectant for adipose tissue-derived adult stem cells. *Tissue Eng Part C Methods*. 2010 Aug;16(4):783-92.

Thirumala S, Zvonic S, Floyd E, Gimble JM, Devireddy RV. Effect of various freezing parameters on the immediate post-thaw membrane integrity of adipose tissue derived adult stem cells. *Biotechnol Prog*, 2005 Sep-Oct;21(5):1511-24.

Tholpady SS, Llull R, Ogle RC, Rubin JP, Futrell JW, Katz AJ. Adipose tissue: stem cells and beyond. *Clin Plast Surg*. 2006 Jan;33(1):55-62.

Tucker HA, Bunnell BA. Characterization of human adipose-derived stem cells using flow cytometry. *Methods Mol Biol*. 2011;702:121-31.

Wang WZ, Fang XH, Williams SJ, Stephenson LL, Baynosa RC, Wong N, Khiabani KT, Zamboni WA. The effect of lipoaspirates cryopreservation on adipose-derived stem cells. *Aesthet Surg J*. 2013 Sep;33(7):1046-55.

Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW Jr. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest*. 2003 Dec;112(12):1796-808.

Wolter TP, von Heimburg D, Stoffels I, Groeger A, Pallua N. Cryopreservation of mature human adipocytes: in vitro measurement of viability. *Ann Plast Surg*, 2005 Oct;55(4):408-13.

Wu X, Peters JM, Gonzalez FJ, Prasad HS, Rohrer MD, Gimble JM.. Frequency of stromal lineage colony forming units in bone marrow of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha-null mice. *Bone*. 2000 Jan;26(1):21-6.

Xu H, Barnes GT, Yang Q, Tan G, Yang D, Chou CJ, Sole J, Nichols A, Ross JS, Tartaglia LA, Chen H. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest*. 2003 Dec;112(12):1821-30.

Yang H, Youm YH, Vandanmagsar B, Ravussin A, Gimble JM, Greenway F, Stephens JM, Mynatt RL, Dixit VD. Obesity increases the production of proinflammatory mediators from adipose tissue T cells and compromises TCR repertoire diversity: implications for systemic inflammation and insulin resistance. *J Immunol*. 2010 Aug;185(3):1836-45.

Yong KW, Pingguan-Murphy B, Xu F, Abas WA, Choi JR, Omar SZ, Azmi MA, Chua KH, Wan Safwani WK. Phenotypic and functional characterization of long-term cryopreserved human adipose-derived stem cells. *Sci Rep*. 2015 Apr;5:9596.

Yu G, Floyd ZE, Wu X, Halvorsen YD, Gimble JM. Isolation of human adipose-derived stem cells from lipoaspirates. *Methods Mol Biol*. 2011;702:17-27.

Yu G, Wu X, Dietrich MA, Polk P, Scott LK, Ptitsyn AA, Gimble JM. Yield and characterization of subcutaneous human adipose-derived stem cells by flow cytometric and adipogenic mRNA analyzes. *Cytotherapy*, 2010 Jul;12(4):538-46.

Zhang N, Dietrich MA, Lopez MJ. Therapeutic doses of multipotent stromal cells from minimal adipose tissue. *Stem Cell Rev and Rep*. 2014 Aug;10(4):600-11.

Zhao J, Yi C, Li L, Zheng Y, Wu K, Liang L, Xia W, Guo S. Observations on the survival and neovascularization of fat grafts interchanged between C57BL/6-gfp and C57BL/6 mice. *Plast Reconstr Surg*. 2012 Sep;130(3):398e-406e.

Zimmerlin L, Donnenberg VS, Pfeifer ME, Meyer EM, Péault B, Rubin JP, Donnenberg AD. Stromal vascular progenitors in adult human adipose tissue. *Cytometry A*. 2010 Jan;77(1):22-30.

Zimmerlin L, Donnenberg VS, Rubin JP, Donnenberg AD.. Mesenchymal markers on human adipose stem/progenitor cells. *Cytometry A*. 2013 Jan;83(1):134-40.

Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P, Hedrick MH. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell*, 2002 Dec;13(12):4279-95.

Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng*. 2001 Apr;7(2):211-28.

NORMAS ADOTADAS

DeCS: descritores em ciências da saúde [Internet]. São Paulo: Biblioteca Virtual em Saúde. 2016 – [atualizado 2016 Mar 3]. Disponível em: <<http://decs.bvs.br/>>.

Federative Committee on Anatomical Terminology. Terminologia anatômica Internacional. Tradução da Comissão de Terminologia Anatômica da Sociedade Brasileira de Anatomia. São Paulo: Manole; 2001.

Ferreira LM et al. Projetos, dissertações e teses: orientação normativa: guia prático. Edição, organização e coordenação de Lydia Masako Ferreira. São Paulo: Red Publicações; 2017.

Hochman B, Nahas FX, Oliveira Filho RS, Ferreira LM. Desenhos de Pesquisa. Acta Cir Bras. 2005;20(Suppl 2):2-9.

Houaiss A. Dicionário da língua portuguesa. 2. ed. Rio de Janeiro: Moderna; 2004.

International Committee of Medical Journals Editors (ICMJE). Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journal. Disponível em: <<http://www.icmje.org/>>.

Patrias K. Citing medicine: the NLM style guide for authors, editors, and publishers [Internet] 2nd ed. Wendling DL, technical editor. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US); 2007. Disponível em: <<http://www.nlm.nih.gov/citingmedicine>>.

Sistema Internacional de Unidades: SI. Duque de Caxias, RJ: INMETRO/CICMA/CEPIN; 2012. Disponível em: <http://www.inmetro.gov.br/inovacao/publicacoes/si_versao_final.pdf>.

APÊNDICES

APÊNDICE 1 – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Tulane University



Western Institutional Review Board®
1019 39th Avenue SE Suite 120 | Puyallup, WA 98374-2115
Office: (360) 252-2500 | Toll Free: (800) 562-4789
www.wirb.com

**Certificate
of
Approval**

THE FOLLOWING WERE APPROVED!!

INVESTIGATOR: James W. Wade MD
5233 Dijon Drive
Baton Rouge, Louisiana 70808

BOARD ACTION DATE: 03/14/2016
PANEL: 4
STUDY APPROVAL EXPIRES: 04/01/2017
STUDY NUM: 1138160
WIRB PRO NUM: 20130449
ONLINE TRACKING:
INVEST NUM: 181501
WO NUM: 1-925706-1
CONTINUING REVIEW: Annually
SITE STATUS REPORTING: Annually
INST. NUM:

SPONSOR: LaCell LLC
PROTOCOL NUM: None
AMD. PRO. NUM:

TITLE:
Isolation of adult stem cells from discarded human tissues removed during surgical procedures including liposuction aspirates, and surgically excised adipose, bone, intestinal or skeletal muscle tissues.

APPROVAL INCLUDES:
Study and Investigator for an additional continuing review period. This approval expires on the date noted above.

WIRB APPROVAL IS GRANTED SUBJECT TO:

WIRB HAS APPROVED THE FOLLOWING LOCATIONS TO BE USED IN THE RESEARCH:
James W. Wade, M.D.; Dijon Cosmetic Surgery Center, 5233 Dijon Drive, Baton Rouge, Louisiana 70808

If the PI has an obligation to use another IRB for any site listed above and has not submitted a written statement from the other IRB acknowledging WIRB's review of this research, please contact WIRB's Client Services department.

ALL WIRB APPROVED INVESTIGATORS MUST COMPLY WITH THE FOLLOWING:

1. Conduct the research in accordance with the protocol, applicable laws and regulations, and the principles of research ethics as set forth in the Belmont Report.
2. Although a participant is not obliged to give his or her reasons for withdrawing prematurely from the clinical trial, the investigator should make a reasonable effort to ascertain the reason, while fully respecting the participant's rights.

IF YOU HAVE ANY QUESTIONS, CONTACT WIRB AT 1-800-562-4789
This is to certify that the information contained herein is true and correct as reflected in the records of the Western Institutional Review Board (WIRB), OHRP/FDA parent organization number IORG 0000432, IRB registration number IRB00000533. WE CERTIFY THAT WIRB IS IN FULL COMPLIANCE WITH GOOD CLINICAL PRACTICES AS DEFINED UNDER THE U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA) REGULATIONS, U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES (HHS) REGULATIONS, AND THE INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION (ICH) GUIDELINES.



3. Unless consent has been waived, conduct the informed consent process without coercion or undue influence, and provide the potential subject sufficient opportunity to consider whether or not to participate. (Due to the unique circumstances of research conducted at international sites outside the United States and Canada, when there is a local IRB and WIRB approved materials are reviewed by the local IRB and translated into the local language, the following requirements regarding consent forms bearing the WIRB approval stamp and regarding certification of translations are not applicable.)
 - a. Use only the most current consent form bearing the WIRB "APPROVED" stamp.
 - b. Provide non-English speaking subjects with a certified translation of the approved consent form in the subject's first language. The translation must be approved by WIRB unless other arrangements have been made and approved by WIRB.
 - c. Obtain pre-approval from WIRB for use of recruitment materials and other materials provided to subjects.
4. Enrollment of limited readers and non-readers: unless consent has been waived or the protocol excludes enrollment of limited readers or non-readers, involve an impartial witness in the consent process when enrolling limited or non-readers and document the participation of the impartial witness using the designated signature lines on the WIRB-approved consent form. In the absence of designated signature lines, download the WIRB standard impartial witness form from www.wirb.com.
5. Obtain pre-approval from WIRB for changes in research.
6. Obtain pre-approval from WIRB for planned deviations and changes in research activity as follows:
 - If the research is federally funded, conducted under an FWA, or is a clinical investigation of a drug or biologic, then all planned protocol deviations must be submitted to WIRB for review and approval prior to implementation except where necessary to eliminate apparent immediate hazards to the human subjects [(DHHS 45 CFR § 46.103(b)(4); (FDA 21 CFR § 56.108(a)(4); ICH 3.3.7)].
 - However, if the research is a clinical investigation of a device and the research is not federally funded and not conducted under an FWA, then only planned protocol deviations that may adversely affect the rights, safety or welfare of subjects or the integrity of the research data should be submitted to WIRB for review and approval prior to implementation except where necessary to eliminate apparent immediate hazards to the human subjects [(DHHS 45 CFR § 46.103(b)(4); (FDA 21 CFR § 56.108(a)(4); ICH 3.3.7)].

The reason for these different requirements regarding planned protocol deviations is that the Office for Human Research Protections (OHRP) and the Food and Drug Administration (FDA) drug and biologic divisions have adopted the regulatory interpretation that every planned protocol deviation is a change in research that needs prior IRB review and approval before implementation; however, the FDA device division operates under a distinct regulation (See 21 CFR 812.150(a)(4)).

Deviations necessary to eliminate apparent immediate hazards to the human subjects should be reported within 10 days.

7. Report the following information items to the IRB within 5 days:
 - a. New or increased risk
 - b. Protocol deviation that harmed a subject or placed subject at risk of harm
 - c. Protocol deviation made without prior IRB approval to eliminate an immediate hazard to a subject
 - d. Audit, inspection, or inquiry by a federal agency
 - e. Written reports of federal agencies (e.g., FDA Form 483)
 - f. Allegation of Noncompliance or Finding of Noncompliance
 - g. Breach of confidentiality
 - h. Unresolved subject complaint
 - i. Suspension or premature termination by the sponsor, investigator, or institution
 - j. Incarceration of a subject in a research study not approved to involve prisoners
 - k. Adverse events or IND safety reports that require a change to the protocol or consent
 - l. State medical board actions
 - m. Unanticipated adverse device effect
 - n. Information where the sponsor requires prompt reporting to the IRB

Information not listed above does not require prompt reporting to WIRB.

Please go to www.wirb.com for complete definitions and forms for reporting.

8. Provide reports to WIRB concerning the progress of the research, when requested.
9. Ensure that prior to performing study-related duties, each member of the research study team has had training in the protection of human subjects appropriate to the processes required in the approved protocol.

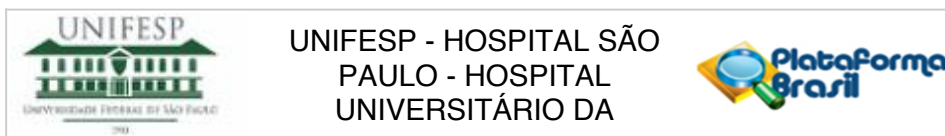
Federal regulations require that WIRB conduct continuing review of approved research. You will receive Continuing Review Report forms from WIRB. These reports must be returned even though your study may not have started.

DISTRIBUTION OF COPIES:

Contact, Company

Jeffrey M. Gimble MD, PhD, LaCell LLC
James W. Wade MD, James W. Wade, M.D.

APÊNDICE 2 – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Unifesp



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: TECIDO ADIPOSEO CRIOPRESERVADO COMO FONTE DE CÉLULAS TRONCO DERIVADAS DE TECIDO ADIPOSEO HUMANO

Pesquisador: FABIANA CRISTINA ZANATA FORTOUL

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 62767916.9.0000.5505

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DE SAO PAULO

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.921.402

Apresentação do Projeto:

Projeto CEP/UNIFESP n:1652/2016 (parecer final)

O tecido adiposo humano tem sido muito utilizado na reconstrução de defeitos de partes moles e, mais recentemente, foi caracterizado como importante fonte Células Tronco denotando um aspecto estrutural e também funcional. A coleta de tecido adiposo pode causar efeitos adversos e tornar-se um fator limitante para utilização imediata ou repetida tornando a criopreservação uma opção para a utilização de tecido armazenado.

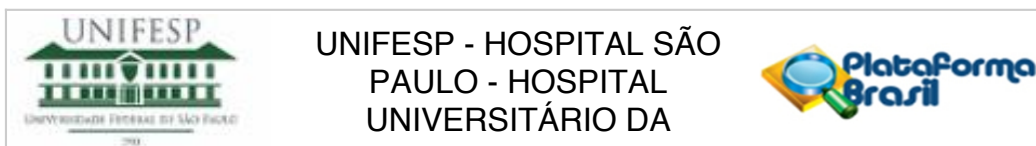
O Objetivo do estudo presente visa a Caracterização do tecido adiposo humano fresco e criopreservado através de análises in vitro e in vivo.

Objetivo da Pesquisa:

-Hipótese: Criopreservação por longo periodo e capaz de manter produção e viabilidade celular da fração vascular estromal e de células tronco derivadas de tecido adiposo humano alem de manterem capacidade funcional como enxerto de tecido adiposo.

-Objetivo Primário: Caracterização do tecido adiposo humano fresco e criopreservado através de análises in vitro.

Endereço: Rua Botucatu, 572 1º Andar Conj. 14
Bairro: VILA CLEMENTINO **CEP:** 04.023-061
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)5571-1062 **Fax:** (11)5539-7162 **E-mail:** secretaria.cepunifesp@gmail.com



Continuação do Parecer: 1.921.402

- Objetivo Secundário: Caracterização do tecido adiposo humano fresco e criopreservado através de análises in vivo

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Em relação aos riscos e benefícios, o pesquisador declara:

-Riscos: Riscos inerentes ao procedimento de lipoaspiração; pesquisa não adicionou riscos ao paciente

-Benefícios: Não se aplica.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Projeto de Doutorado Sanduiche com todos os experimentos realizados no Laboratório da Tulane University, New Orleans, EUA;

Aluna do Programa de Pós-graduação em Cirurgia Translacional da UNIFESP e o projeto desenvolvido como parte do Doutorado Sanduiche com bolsa pela CAPES;

Projeto vinculado ao Departamento de Cirurgia – Cirurgia Plástica, UNIFESP, Campus São Paulo.

Orientação de Dra. Lydia Masako Ferreira.

Trata-se de um estudo experimental primário, prospectivo, analítico, controlado, aleatorizado. A amostra consistirá em fragmentos de gordura obtido de pacientes submetidas a lipoaspiração para a obtenção de hASC (gênero, idade, peso, dados antropométricos). As pacientes que concordarem em participar do estudo deverão assinar o termo de consentimento informado.

As hASC serão caracterizadas, submetidas a cultura e expansão, criopreservação e analisadas suas capacidades de diferenciação adipogênica, osteogênica e condrogênica.

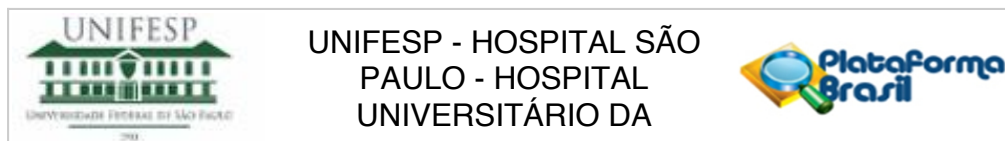
O estudo será submetido a avaliação do Comitê de Ética da Universidade Federal de São Paulo e da Universidade de Tulane, New Orleans, EUA.

O estudo será realizado no Laboratório Tulane Center for Stem Cell Research and Regenerative Medicine, New Orleans, EUA.

Obtenção de tecido adiposo

Tecido gorduroso obtido de lipoaspiração usando cânulas de lipoaspiração de 3 a 5mm com técnica tumescente (5 pacientes) e seca (5 pacientes). Serão selecionadas 10 pacientes com índice de massa corporal dentro dos limites de normalidade (20–25 kg/m²), sem comorbidades, com idade entre 18 e 60 anos que serão submetidas a lipoaspiração de região abdominal. Todas as cirurgias serão eletivas e realizadas pelo mesmo cirurgião plástico (15, 18).

Endereço: Rua Botucatu, 572 1º Andar Conj. 14
Bairro: VILA CLEMENTINO **CEP:** 04.023-061
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)5571-1062 **Fax:** (11)5539-7162 **E-mail:** secretaria.cepunifesp@gmail.com



Continuação do Parecer: 1.921.402

Cada amostra será dividida em 2 grupos (tecido fresco e tecido criopreservado), sendo que a cultura de cada grupo será realizada em triplicata. De cada grupo de FVE e ASC isoladas serão caracterizadas através de ensaios de viabilidade e diferenciação e análise de marcadores de superfície. O tecido também será implantado em animais para caracterização dos enxertos in vivo.

Isolamento de células tronco derivadas de tecido adiposo

O isolamento das ASC será realizado por preparação enzimática.

Viabilidade celular e capacidade proliferativa / Cultura e expansão

As ASC terão sua viabilidade estudada através do ensaio de apoptose da anexina V e analisado por citometria de fluxo (23) As células também sua caracterização imunofenotípica através da identificação de marcadores de superfície CD37, CD90 e CD105, e ausência de CD16, CD34 e CD45 (15). Após a análise de viabilidade e identificação dos marcadores de superfície caracterizando as células como ASC, as células serão submetidas a ensaios de diferenciação

Diferenciação osteogênica in vitro

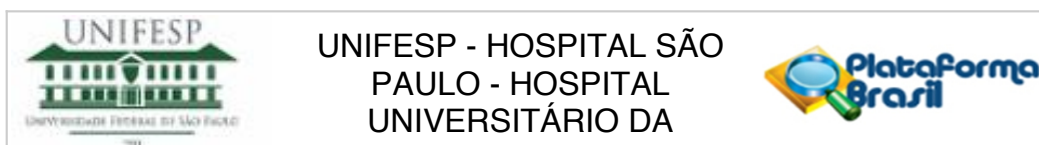
Para a diferenciação osteogênica as células serão semeadas em placas de 6 poços até confluência de 80% quando terão seus meios de cultura trocados por meio de diferenciação osteogênica (ODM), que consiste em Dulbecco's modified Eagle's suplementado com 10% FBS, 1% penicilina/streptomina, 100 gr/ml ácido ascórbico e 10 mM glycerophosphate. Após 14 dias será fixado e corado com corante alizarin para quantificação fotométrica para avaliar mineralização extracelular. A expressão gênica das células será analisada aos 14 dias pela PCR Quantitativa (15, 16, 20).

Diferenciação adipogênica in vitro

Para a diferenciação osteogênica as células serão semeadas em placas de 6 poços até confluência de 80% quando terão seus meios de cultura trocados por meio de diferenciação adipogênica que consiste em Dulbecco's modified Eagle's medium, 10% FBS, 1% penicillin/streptomycin, 10 µg/ml insulín, 1 µM dexamethasone, 0.5 mM methylxanthine, and 200 nM indomethacina. Após 7 dias as amostras serão fixadas e coradas com coloração Oil Red O e a expressão gênica será realizada por qRT-PCR (15, 16, 20).

Análise estatística

Endereço: Rua Botucatu, 572 1º Andar Conj. 14
Bairro: VILA CLEMENTINO **CEP:** 04.023-061
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)5571-1062 **Fax:** (11)5539-7162 **E-mail:** secretaria.cepunifesp@gmail.com



Continuação do Parecer: 1.921.402

Os dados numéricos serão apresentados em medias de desvio padrão. Á análise estatística será feita usando análise de variância para comparação de múltiplos grupos seguida de teste de Newman-Keuls com valor de p menor de 5%. (20).

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Documentos obrigatórios apresentados adequadamente, conforme parecer consubstanciado inicial

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Trata-se de respostas de pendências ao parecer original consubstanciado CEP nº 1.888.982 de 11/01/2017, quanto aos seguintes questionamentos abaixo:

1-O projeto detalhado que foi enviado, está em inglês e em formato não usual (parecer ser um formulário de submissão, em que só estão descritas as metodologias laboratoriais). Por determinação do Sistema CEP/CONEP, o projeto deve ser submetido em português. Favor enviar o projeto em português e no formato usual, para que a análise possa ser feita adequadamente.

Projeto em Português anexado;

CEP-UNIFESP: PENDÊNCIA ATENDIDA

2-Como o projeto completo não foi enviado de forma adequada, vários pontos não estão claros: O estudo foi todo, ou só uma parte, realizado nos EUA?

Projeto de Doutorado Sanduiche com todos os experimentos realizados no Laboratório da Tulane University, New Orleans, EUA;

CEP-UNIFESP: PENDÊNCIA ATENDIDA

3-Não ficou claro a situação desta presente submissão: foi informado no cadastro CEP/UNIFESP, que este estudo não envolve a obtenção de titulação. Entretanto, trata-se de bolsa sanduíche e existe um orientador. Favor esclarecer.

Sou aluna do Programa de Pós-graduação em Cirurgia Translacional da UNIFESP e o projeto desenvolvido como parte do Doutorado Sanduiche com bolsa pela CAPES;

CEP-UNIFESP: PENDÊNCIA ATENDIDA

4-Foi enviada carta de aprovação da CEUA/UNIFESP, com a denominação de Parecer CONEP (Pasta: Parecer Anterior - Submissão 1; Documento: ParecerCONEP.pdf). lembramos que CONEP, é a

Endereço: Rua Botucatu, 572 1º Andar Conj. 14

Bairro: VILA CLEMENTINO

CEP: 04.023-061

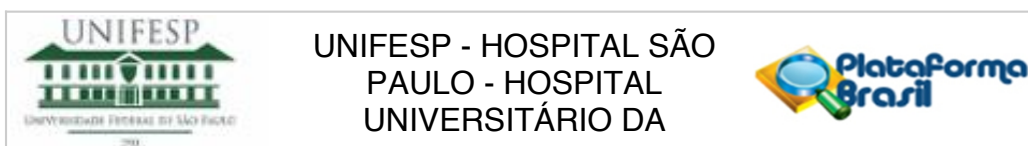
UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)5571-1062

Fax: (11)5539-7162

E-mail: secretaria.cepunifesp@gmail.com



Continuação do Parecer: 1.921.402

Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (seres humanos) e não tem nenhuma relação com a Comissão de Ética no uso de Animais (CEUA).

A carta de homologação pela CEUA foi anexada com o intuito de esclarecer a situação geral do projeto. Compreendo que são comissões diferentes.

CEP-UNIFESP: PENDÊNCIA ATENDIDA

Considerações Finais a critério do CEP:

O CEP informa que a partir desta data de aprovação, é necessário o envio de relatórios parciais (anualmente), e o relatório final, quando do término do estudo.

Parecer acatado "ad ref" pelo coordenador

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_807411.pdf	31/01/2017 14:39:37		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projetodetalhado.docx	31/01/2017 14:38:58	FABIANA CRISTINA ZANATA FORTOUL	Aceito
Folha de Rosto	folhaDeRosto.pdf	31/01/2017 14:37:46	FABIANA CRISTINA ZANATA FORTOUL	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Consentimentoesclarecido.pdf	31/01/2017 14:36:23	FABIANA CRISTINA ZANATA FORTOUL	Aceito
Parecer Anterior	PB_PARECER_CONSUBSTANCIADO_CEP_1888982.pdf	31/01/2017 14:33:19	FABIANA CRISTINA ZANATA FORTOUL	Aceito
Outros	Respostapendencias.docx	19/01/2017 11:26:11	FABIANA CRISTINA ZANATA FORTOUL	Aceito
Outros	Projeto.docx	19/01/2017 11:24:51	FABIANA CRISTINA ZANATA FORTOUL	Aceito

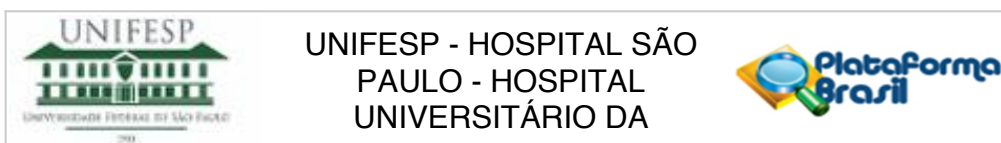
Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Rua Botucatu, 572 1º Andar Conj. 14
Bairro: VILA CLEMENTINO **CEP:** 04.023-061
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)5571-1062 **Fax:** (11)5539-7162 **E-mail:** secretaria.cepunifesp@gmail.com



Continuação do Parecer: 1.921.402

SAO PAULO, 10 de Fevereiro de 2017

Assinado por:
Miguel Roberto Jorge
(Coordenador)

APÊNDICE 3 – Termo de consentimento livre esclarecido usado para a coleta e processamento de tecido adiposo humano para pesquisa

RESEARCH SUBJECT INFORMATION AND CONSENT FORM

TITLE: Isolation of adult stem cells from discarded human tissues removed during surgical procedures including liposuction aspirates, and surgically excised adipose, bone, intestinal or skeletal muscle tissues.

PROTOCOL NO.: None
WIRB® Protocol #20130449

SPONSOR: LaCell LLC

INVESTIGATOR: James W. Wade, M.D.
5233 Dijon Drive
Baton Rouge, Louisiana 70808
United States

SITE(S): James W. Wade, M.D.; Dijon Cosmetic Surgery Center
5233 Dijon Drive
Baton Rouge, Louisiana 70808
United States

STUDY RELATED PHONE NUMBER(S): Jeffrey M. Gimble, M.D., Ph.D (Sponsor)
(504) 598-5246

James Wade,
M.D. 225-769-
9966 (24 hours)

This consent form may contain words that you do not understand. Please ask the study doctor or the study staff to explain any words or information that you do not clearly understand. You may take home an unsigned copy of this consent form to think about or discuss with family or friends before making your decision.

What you should know about a research study

- We give you this consent form so that you may read about the purpose, risks and benefits of this research study.
- The main goal of research studies is to gain knowledge that may help future patients.

- You have the right to refuse to take part, or agree to take part now and change your mind later on.
- Please review this consent form carefully and ask any questions before you make a decision.
- Your participation is voluntary.
- By signing this consent form, you agree to participate in the study as it is described.

Introduction

Dr. Wade is the study doctor on this study while Dr. Gimble directs the stem cell research and commercial portion of this study. We expect about 1000 subjects from Baton Rouge will be enrolled in this study. The study will take place over a period of 10 years. Your expected time commitment to the study is the time during the course of cosmetic liposuction, intra-abdominal surgery, or related elective surgical procedure such as lipoma resection. The fat or skeletal muscle and serum sample removed during cosmetic liposuction, intra-abdominal surgery, or related elective surgery will be transferred to LaCell LLC laboratories where it will be used for research and the development of commercial research-related cell products. Dr. Wade and his staff receive no compensation for your participation in this study. Dr. Wade and his staff are involved only to support the research efforts of LaCell LLC, their collaborators and their clients.

Where is the study being conducted?

You will have the liposuction, intra-abdominal surgery, or related elective procedure done at the site agreed upon by you and Dr. Wade. Fat or skeletal muscle tissue samples and serum specimens from your procedure will be sent to the LaCell, LLC, a for-profit biotechnology company that provides and sells cell- and tissue-based products to academic and commercial laboratories for research purposes only. The stem cell study takes place in the LaCell, LLC laboratories in Baton Rouge and New Orleans.

What is the purpose of this study?

This study will find out how the stem cells in adult human fat or skeletal muscle divide and how they decide to become fat cells, bone-forming cells, cartilage-forming cells, or other tissue types.

Who is eligible to participate in the study? Who is ineligible?

The following subjects are eligible to participate in the study:

1. Volunteers 18 years or older undergoing an elective surgical procedure.

The following subjects are ineligible to participate in the study:

1. Those with a history or risk of specific infectious and/or virally transmitted

disease.

2. Pregnant women.

What will happen to you if you take part in the study?

If you take part in the study, you can expect the following:

You will undergo a liposuction, intra-abdominal surgery, or related elective procedure such as lipoma resection that is no different from that you would experience if you were not a study subject.

You will have a small volume (2 to 3 tablespoons) of blood removed at the time of your procedure by the study doctor or his research associates and this will be transferred to LaCell LLC for processing as a serum sample.

Your fat adipose or skeletal muscle waste tissue will be removed from the operating room and transported from the offices of the study doctor (Dr. Wade) to LaCell LLC laboratories for processing.

The serum sample will be used to determine the levels of sugar (glucose), fats (triglycerides), and proteins (insulin) in your blood under fasting conditions. This information will be used only for research purposes and will not be placed in your medical records.

The fat adipose or skeletal muscle waste tissue is used in experiments at LaCell LLC and for the isolation of cells, proteins, RNA and DNA. The tissue is discarded when the experiment is over. It is not possible to reclaim the waste tissue once it has been removed. It is possible that the cell lines generated will be licensed to pharmaceutical or biotechnology companies for drug discovery and tissue research activities. There are no plans to pay you for any future commercial use of your tissue or the materials derived from it.

What are the possible risks and discomforts?

The study will not present any additional risks or discomforts to you other than the discomfort of having the liposuction, intra-abdominal surgery, or related elective procedure.

What are the possible benefits?

There are no benefits from your being in the study except that it may contribute to the body of knowledge relating to the biology of fat tissue and obesity.

What charges will you have to pay?

You will not be charged for participation in the study.

What payment will you receive?

You will not receive any payment for participation in the study.

If you do not want to take part in the study, are there other choices?

You have the choice at any time not to participate in this research study. If you choose not to participate, your procedure will be done as scheduled and described and any future medical care will not be affected in any way.

If you have any questions or problems, whom can you call?

If you have questions, concerns or complaints about the research or if you think you have had a research-related injury or medical illness, you should call the following numbers to reach your surgeon: For Dr. Wade, call 225-769-9966 during regular working hours. After working hours you should call the answering service at 225-769-9966. The on-call physician will respond to your call.

If you have questions about your rights as a research subject or if you have questions, concerns or complaints about the research, you may contact:

Western Institutional Review Board® (WIRB®)
3535 Seventh Avenue, SW
Olympia, Washington 98502
Telephone: 1-800-562-4789 or 360-252-2500
E-mail: Help@wirb.com

WIRB is a group of people who perform independent review of research.

WIRB will not be able to answer some study-specific questions, such as questions about appointment times. However, you may contact WIRB if the research staff cannot be reached or if you wish to talk to someone other than the research staff.

Do not sign this consent form unless you have had a chance to ask questions and have received satisfactory answers to all of your questions.

What information will be kept private?

LaCell LLC will not have access to your medical records. The tissue samples collected from you will not be stored with your name or any other identifying information. Your cells will be shared with collaborators at Columbia University, Memorial Sloan Kettering Cancer Center, Tulane University, and Tufts University or sold to investigators at other academic and commercial research laboratories. Results of the study may be published, but because of the anonymity of the samples, confidentiality will not be breached. Since the samples are anonymous for the study doctors at LaCell LLC, there is no way that your name or identifying information can be linked to the results directly.

Records that you give us permission to keep, and that identify you, will be kept confidential as required by law and will be placed only in your medical records maintained in the office of your private surgeon; no copy of these documents will be transmitted to the investigators at the LaCell LLC. Federal Privacy Regulations provide safeguards for privacy, security, and authorized access. Except when required by law, you will not be identified by name, social security number, address, telephone number, or any other direct personal identifier in records disclosed outside of LaCell LLC. For records disclosed outside of LaCell LLC, you will be assigned a unique code number.

Because the tissue samples are anonymous, there is no way that the tissue can be traced back to you.

Can your taking part in the study end early?

Your participation in this study is voluntary. You may decide not to participate or you may leave the study at any time. Your decision will not result in any penalty or loss of benefits to which you are entitled.

Your participation in this study may be stopped at any time by the study doctor or the sponsor without your consent for any of the following reasons:

- if it is in your best interest;
- you do not later consent to any future changes that may be made in the study plan;
- or for any other reason.

Because the tissue samples will be made anonymous before being sent to LaCell LLC, you will be unable to request that your tissue be removed from the study after your procedure has been completed.

What if information becomes available that might affect your decision to stay in the study? You will be told about any new information that might change your decision to be in this study. You may be asked to sign a revised consent form if this occurs.

Will you be compensated for a study-related injury or medical illness?

This study is a minimal risk study. LaCell LLC has no plans to compensate you for medical treatment or for other damages (for example lost wages, time lost from work, etc.) that may result from your participation in this research.

By signing this consent form, you will not give up any legal rights.

Source of Funding

Funding for this research study will be provided by LaCell LLC.

If you agree to be in this study, you will be given a copy of the consent form.

Signatures

I have read the information in this consent form (or it has been read to me). The study has been discussed with me and all my questions have been answered. Additional questions regarding the study should be directed to the study doctors. I freely consent to be in this research.

By signing this consent form, I have not given up any of my legal rights.

Printed Name of Subject

Signature of Subject Date

Signature of Person Conducting Informed Consent Discussion

Date

Name of Principal Investigator

Principal Investigator James W. Wade, M.D.

----- Use the following only if applicable -----

If this consent form is read to the subject because the subject is unable to read the form, an impartial witness not affiliated with the research or investigator must be present for the consent and sign the following statement:

I confirm that the information in the consent form and any other written information was accurately explained to, and apparently understood by, the subject. The subject freely consented to be in the research study.

Signature of Impartial Witness

Date

Note: This signature block cannot be used for translations into another language. A translated consent form is necessary for enrolling subjects who do not speak English.

APÊNDICE 4 – Aprovação do Comitê de Ética em Uso de Animais da Tulane University



Institutional Animal Care & Use Committee

October 8, 2015

To Whom It May Concern:

The animal protocol of the following application submitted to you was reviewed and approved by this Institution's Animal Care and Use Committee on October 6, 2015 and does not expire until October 6, 2018.

TITLE OF APPLICATION: Stromal Vascular Fraction and Adipose Derived Stem Cells as Enrichment Factors to Freshly Processed and Cryopreserved Fat Grafts

PRINCIPAL INVESTIGATOR: Jeffrey Gimble, M.D., Ph.D.

NAME OF INSTITUTION: Tulane University

This institution has received continued full accreditation by AAALAC and has an Animal Welfare Assurance on file with the Office of Laboratory Animal Welfare. The Assurance Number is A4499-01, effective 6/4/2014 through 3/31/2018.

Sincerely,

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Sheila H. Garrison'.

Sheila H Garrison
Chair, IACUC

SHG/pc
Cc: File

Downtown Campus • *National Primate Research Center* • *Uptown Campus*
1430 Tulane Ave., Box 8423 New Orleans, LA 70112 tel 504.988.6868 fax 504.988.1445
<http://tulane.edu/asvpr/iacuc/>

APÊNDICE 5 – Aprovação do Comitê de Ética em Uso de Animais da Unifesp



Comissão de Ética no Uso de Animais

São Paulo, 02 de setembro de 2016

Ilmo(a). Sr(a).
Pesquisador(a): Fabiana Cristina Zanata Fortoul
Depto/Disc: Departamento de Cirurgia Translacional
Orientador: Profa. Dra. Lydia Masako Ferreira

Título do projeto: "Tecido adiposo criopreservado como fonte de células tronco derivadas de tecido adiposo humano"

Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais UNIFESP

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Paulo, na reunião de 01/09/2016, **ANALISOU** e **HOMOLOGOU** a carta de aprovação nº A4499-01.

"A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Paulo, no uso de suas atribuições, tendo em vista no que consta no parecer do processo nº A4499-01 do Comitê de Ética no Uso de Animais da Tulane University homologa a carta de aprovação da estudante Fabiana Cristina Zanata Fortoul. A vigência do estudo é Junho/2014 a Março/2018"

Monica Levy Andersen
Presidente da CEUA – UNIFESP

APÊNDICE 6 – Protocolo de processamento do tecido adiposo por digestão enzimática do Laboratório de Pesquisa com Células-tronco da Tulane University e adaptado ao projeto

Tissue Processing

Date: _____ Operator: _____ Lot Number: _____ LaCell Product Number: _____

Physician Name: _____

Operation Identification: _____

Depot: Abdomen Arm Breast Buttock Calf Chin Face Flank Thigh Other _____

8. Tissue Acquisition: Record Time: _____ Date: _____ Tissue weight or volume: _____

9. _____
Transfer tissue to sterile 250ml bottle.

10. Wash tissue with equal volume of pre-warmed (37°C) sterile PBS solution. Aspirate infranatant solution after tissue spinning 1200rpm/1min.

11. Repeat Wash tissue with equal volume of pre-warmed (37°C) sterile PBS solution. Total # of PBS Washes: _____

12. Aliquot: 3.0ml AT for FAT FG; 1.0ml AT in Formalin for Histology; Cryopreserve 50ml AT (see attached protocol).

13. Weigh out Type I collagenase based on volume of tissue (1 mg/ml of tissue). Record collagenase wt: _____ mg

14. Weigh out Fraction V BSA (bovine serum albumin) based on volume of tissue (10 mg/ml of tissue). Record BSA wt: _____ mg

15. Dissolve collagenase and BSA in pre-warmed 37°C PBS solution (1 ml per 1 mg collagenase and 10 mg of BSA) inside Biological Safety Cabinet.

16. Add 200 mM CaCl₂ to collagenase/BSA solution (1 µl per ml) inside Biological Safety Cabinet. Record 200 mM CaCl₂ vol: _____ µl

17. Sterile filter collagenase/BSA solution through 0.2µm filter inside Biological Safety Cabinet.

18. Add filtered collagenase/BSA solution to equal volume of tissue inside Biological Safety Cabinet. Time/Date: _____

19. Set sealed closed sterile container with tissue/collagenase-BSA solution on shaker/rotator set between 80 to 120 revolutions per minute and 37°C. Record Start Time: _____

20. Digest for between 50 to 70 minutes. Record Stop Time: _____; Record Total Digest Time: _____ min

21. Centrifuge tissue digest at 300xg (1200 rpm)/5min at room temperature.

22. Resuspend tissue pellet by gentle shaking.

23. Repeat centrifugation of tissue digest at 300xg (1200 rpm)/5min at room temperature.

24. Aspirate supernatant from cell pellet inside Biological Safety Cabinet with 25ml pipette, carefully removing oil and leaving the tissue pellet intact and transfer to 50ml tube (pouring).

25. Resuspend cell pellet in sterile prewarmed 37°C PBS solution (10 -20 ml per 100 ml of tissue digest) inside Biological Safety Cabinet. Record Resuspension

Volume of PBS: _____ ml Time/Date: _____

26. Centrifuge cell pellet at 300xg (1200rpm)/5min at room temperature.
27. Aspirate supernatant from cell pellet inside Biological Safety Cabinet with 25ml pipete, carefully removing PBS and leaving the tissue pellet intact
28. Resuspend cell pellet in prewarmed 37°C Stromal Medium (15ml) inside of Biological Safety Cabinet.
29. Filter cell pellet in a 200um Cell Strainer.
30. Proceed to SVF cell count and viability (see attached protocol) (keep cell suspension on ice).
31. Aliquot 1.0×10^6 cells for SVF Flow Cytometry (Take to Alan Tucker at Tulane) (see attached protocol).
32. Aliquot 10000 SVF for CFU-F (see attached protocol).
33. Aliquot 1.0×10^6 SFV cells for T25 flask and add Stromal Media to reach total of 4ml volume.
34. Transfer T25 flasks to humidified 5% CO₂ incubator at 37°C.
35. After 24 to 48 hours, remove medium from flasks by vacuum aspiration in Biological Safety Cabinet, wash with PBS.
36. Replace with fresh volume of 5 ml prewarmed 37°C Stromal Medium.
37. Return T25 flasks to humidified 5% CO₂ incubator at 37°C.
38. Incubate until cells reach 80-90% confluence based on phase contrast microscopic monitoring and proceed to Harvesting ASC from Tissue Culture Flask (see attached protocol).
39. If there are SVF cells left, centrifuge the conical tube at 1200 rpm/5min;
40. Aspirate the bubbles near the surface and then the rest of the medium, leaving behind the cell pellet;
41. Resuspend the cell pellet with cold cryomedium (2.5×10^6 SVF/ml cryomedium);
42. Pipet 1ml of freezing medium/cell solution (2.5×10^6 SVF) into each cryovial as quickly as possible and label each (print out on cryolabel stickers) with lot number, passage number, and concentration of cells (do not date);
43. Place these cryovials in a cryofreezing container and into the -80°C freezer overnight. The next day, transfer them to the LN tank and update tank database; Record LN tank _____; Box ____; # ____ to ____.

Cell Count & Viability – SVF

1. After harvesting cells and resuspending them in ~1 million/ml concentration, use a hemacytometer to manually count the live and dead cells.
2. Cell counts and viability stain: ethidium bromide (EtBr) and acridine orange (AO) live dead solution and hemocytometer counts according to LaCell LLC Standard Operating Procedure (SOP) “Cell Counting with Neubauer Chamber” dated 7.26.13.
3. First, resuspend 10µl of the cell/media solution with 10µl of EtBr-AO solution (or a 1:1 dilution).
4. Take 10µl of this resuspended mixture and pipet onto each side of the hemacytometer.
5. The number of live (green fluorescent, FITC channel) and dead (red fluorescent, Rhodamine channel) cells is determined using 10x magnification on a binocular phase contrast microscope.

- a. Count the live and dead cells in each of the 4 quadrants each side, counting at least 200 cells.

Live #1		Live # 2		Dead # 1		Dead # 2	

- b. Use up to 9 squares if cell density is low.

Average Live:

Average Dead:

Total Live + Dead Cells:

6. Calculate viability: live cells/(live + dead cells): ____ %
 7. Calculate total number of viable cells: (Average number of live cells in the 4 quadrants) x 2 x 10⁴ x total volume: _____ cells

Flow Cytometry Staining – SVF

1. Centrifuge 1.0 x 10⁶ SVF in a microcentrifuge tube 1200 rpm/5 minutes at room temperature.
2. Pipet out the media and resuspend cells in 400 µl of cold PBS.
3. Send the samples to Alan Tucker at Tulane for analysis, keeping tubes on ice during transfer.
4. Next, fluorochrome-conjugated monoclonal antibodies should be added to the cells in a dark room (see below for volumes that need to be pipetted thoroughly with cells).

Tube 1: CD36 FITC 10µl, CD34 PE 10µl, CD19 ECD 5µl, CD45 PeCy7 5µl.

Tube 2: CD3 PeCy7 5µl, CD146 PE 10µl, CD31 FITC 5 µl

Tube 3: CD73a PE 10µl

Tube 4: Isotype control.

CFU-F

1. Plate SVF into 6-well plates at a density of 5000, 2500, 1000, 500, 250, 100 cells per well in 2 ml of stromal medium. Leave plate in incubator overnight. Plate ASC into 6 well plates at a density of 50 or 100 cells per triplicate wells in 2 ml of stromal medium. Leave in incubator overnight.
2. Change media every week and keep checking cells to make sure colonies are forming but not reaching confluence in each well.
3. After 14 days, stain the wells with toluidine blue (stromal/CFU-F wells)
4. For the stromal fibroblasts, the cells should be rinsed twice with warm phosphate-buffered saline (PBS) and fixed with 10% formalin (1ml) for 20 minutes at room temperature. The cells can then be stained for 1 hour with 0.1% Toluidine blue in 1% paraformaldehyde in PBS. Stained cells should be gently rinsed with tap water twice and photographed using a computer scanner (10% formalin = 27ml H₂O + 10ml 37% Formalin).
5. Count colonies with more than 32 stained cells. Normalized values = # colonies counted / # cells seeded.

Adipose Tissue Cryopreservation/Thawing

1. Aliquot 50ml AT for cryopreservation
2. Add CPA 2x to AT (same volume);
3. Transfer 4.5ml AT+CPA to 5ml cryovial;
4. Record number of vials: ____ vials.

5. Transfer to -80°C freezer (Mr. Frosty).
6. The next day, transfer to LN tank; Record LN tank _____; Box _____
7. Thaw cryovials after 1 month in water bath for experiments;
8. Thaw individual vials by agitating for 1 minute in 37°C water bath.
9. Transfer AT to a 15 ml conical tube containing 5 ml of Stromal Medium to dilute the CPA (use 50ml tubes if thawing more than 1 vial).
10. Repeat washing with Stromal Media
11. Centrifuge the 15 ml conical tube at 1200 rpm (300 X g)/5 minutes at room temperature.
12. Aspirate infranatant.
13. Aliquot: 3.0ml AT for CAT FG; 1.0ml AT in Formalin for Histology
14. Begin Tissue Processing from step 6 (see attached protocol).

Harvesting hASC from Tissue Culture Flasks/ASC cell counting

1. Take out the flasks from the incubator.
2. Aspirate the medium from each flask.
3. Rinse flasks with 5ml of prewarmed 37°C PBS per T25 flask inside Biological Safety Cabinet and rock to make sure all cells are washed (let it sit for a few minutes).
4. Aspirate the PBS from the flasks.
5. Add 2 ml of prewarmed 37°C trypsin solution (0.05% in EDTA) or TrypLE solution per T25 flask inside of Biological Safety Cabinet (6 ml for each T-175, 4 ml for each T-75, 2 ml for each T-25), making sure the bottom of the flasks are entirely covered.
6. Return T25 flasks to humidified 5% CO₂ incubator at 37°C for 5 minutes until adherent cell layer has detached and separated into individual cells based on phase contrast microscopy. Time in incubator: ___ min.
7. Neutralize the trypsin by adding an equal volume of stromal medium to trypsin in each flask (ie. 2ml stromal for 2 ml trypsin for T25 flask); Record Stromal Medium vol: ___ ml.
8. Pipet up and down all around in the flask to make sure all cells are washed off (try not to make any bubbles at this step).
9. Collect the cells/medium from the flask and pipet into a 15ml conical tube inside of Biological Safety Cabinet; Record total cell suspension volume: ___ ml
10. Remove 10 µl aliquot of cell digest using sterile tip micropipetter and transfer to Eppendorf tube inside of Biological Safety Cabinet.
11. Dilute cells with 10µl Trypan Blue Solution. Record dilution factor: 2x
12. Count number of live cells in each of 4 squares of Hemocytometer. Record cell number for each of 4 squares of hemocytometer in the table of operation sheet

Average Live:

13. Calculate total number of viable cells: (Average number of live cells in the 4 quadrants) x 2 x 10⁴ x total volume: _____ cells
14. Aliquot 1.5 x 10⁶ cells for ASC Flow Cytometry (see attached protocol).
15. Aliquot 1.0 x 10⁶ ASC cells for Differentiation Assays (see attached protocol).
16. If there are ASC cells left, centrifuge the conical tube for 5 minutes at 1200 rpm.

17. Aspirate the bubbles near the surface and then the rest of the medium, leaving behind the cell pellet.
18. Resuspend the cell pellet with cold cryomedium (1.0×10^6 cells/ml cryomedium).
19. Take out 1 cryovial per million cells and label each (print out on cryolabel stickers) with lot number, passage number, and concentration of cells (do not date).
20. Pipet 1 ml of freezing medium/cell solution into each cryovial as quickly as possible.
21. Place these cryovials in a cryofreezing container and into the -80°C freezer overnight. The next day, transfer them to the LN tank and update tank database: LN tank _____; Box ____; # ___ to ____.

SVF and ASC Thawing for experiments

1. Take cryovial out of the LN Tank.
2. Thaw vial by agitating for in 37°C water bath/1 minute.
3. Transfer cell suspension to a 15 ml conical tube containing 5 ml of Stromal Medium.
4. Centrifuge the 15 ml conical tube at 1200 rpm (300 X g)/ 5 minutes at room temperature.
5. Aspirate supernatant.
6. Suspend cell pellet in 1 ml Stromal Medium and proceed to cell count and viability (see attached protocol).

APÊNDICE 7 – Piloto

Fragmentos de tecido adiposo humano descelularizado foram implantados em região dorsal de camundongos transgênicos GFP positivos C57BL para avaliação da capacidade do arcabouço do tecido adiposo servir como domicílio para a repopulação com células do receptor. Os enxertos foram removidos após três, seis e nove semanas pós-implantação e constatou-se a funcionalidade e o repovoamento dos arcabouços com células adiposas do camundongo através de imuno-histoquímica (perilipina, GFP e CD31).

PUBLICAÇÕES DA TESE

Gimble JM, Ray SP, Zanata F, Wu X, Wade J, Khoobehi K, Ferreira LM, Bunnell BA. Adipose derived cells and tissues for regenerative medicine. ACS Biomater Sci Eng. 2016 June 24;1 (Review). DOI: 10.1021/acsbio.6b00261.

Zanata F, Bowles A, Frazier T, Curley L, Bunnell BA, Wu X, Wade J, Devireddy R, Gimble JM, Ferreira LM. Effect of cryopreservation on human adipose tissue and isolated stromal vascular fraction cells *in vitro* and *in vivo* analyses. Accepted for publication Plast Reconstr Surg, June, 2017.

Zanata F, Shaik S, Devireddy RV, Wu X, Ferreira LM, Gimble JM. Cryopreserved adipose tissue-derived stromal/stem cells: potential for applications in clinic and therapy. In Karimi-Busheri F & Weinfeld M, editors. Biobanking and cryopreservation of stem cells. New York, NY: Springer International Publishing; 2016; p. 137-146. (Advances in Experimental Medicine and Biology, 951). DOI: 10.1007/978-3-319-45457-3_11.

FONTES CONSULTADAS

Gimble JM, Bunnell BA. Adipose derived stem cells: methods and protocol. 1st ed. Louisiana: Humana Press; 2011.

Kirkwood BR, Sterne, JAC. Essential medical statistics. 2 ed. Massachusetts: Blackwell Science; 2006.

McCullagh P, Nelder, JA. Generalized linear models. 2 ed. New York: Chapman and Hall; 1989.

Neter J, Kutner MH, Nachtsheim CJ, Wasserman W. Applied linear statistical models. 4 ed. Boston: Irwin; 1996.