

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM CLÍNICA CIRÚRGICA

**INFLUÊNCIA DA ZONA DOADORA NA CONCENTRAÇÃO DE CÉLULAS-
TRONCO DERIVADAS DO TECIDO ADIPOSEO EM MULHERES**

ALEXANDRE VONTOBEL PADOIN

Tese apresentada como parte dos requisitos para a
obtenção do título de Doutor em Medicina.

Área de concentração: Clínica Cirúrgica

Orientador: Prof. Dr. Jefferson Braga da Silva

Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Denise Cantarelli Machado

Porto Alegre

2008

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)

P124i Padoin, Alexandre Vontobel
Influência da zona doadora na concentração de células-tronco derivadas do tecido adiposo em mulheres / Alexandre Vontobel Padoin; orient. Jefferson Braga da Silva; co-orient. Denise Cantarelli Machado. Porto Alegre: PUCRS; 2008.

53f.: gráf. il. tab.

Tese (Doutorado) – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde. Área de concentração: Cirurgia.

1. CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS. 2. LIPECTOMIA. 3. ENGENHARIA TISSULAR. 4. TECIDO ADIPOSEO. 5. MULHERES. 6. ESTUDOS TRANSVERSAIS. I. Silva, Jefferson Braga da. II. Machado, Denise Cantarelli. III. Título.

C.D.D. 574.87
C.D.U. 576:616.599(043.2)
N.L.M. QU 325

AGRADECIMENTOS

- Ao Professor Dr. Jefferson Braga da Silva pela orientação e apoio prestado durante todas as fases de realização deste trabalho.
- Aos meus pais, que sempre me estimulam a não parar.
- Ao Dr. Antônio Roberto da Rosa Rezende, Dra. Kátia Rezende, Dra. Bianca Grechi responsáveis pela coleta do material.
- À Equipe do Instituto de Pesquisas Biomédicas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (IPB-PUC-RS), em especial a Professora Dr.^a Denise Canterelli Machado, que processou o material.
- À Rita pelo apoio e ajuda na revisão do trabalho.
- Ao Dr. Marcelo Tadday pela ajuda na revisão ortográfica.
- Ao Acadêmico de Medicina Daniel Gehlen, grande parceiro de trabalho.
- Ao Professor Dr. Cláudio Corá Mottin pelo apoio e estímulo à pesquisa.
- Ao Professor Dr. Pedro Martins pelo estímulo a realizar este estudo.
- Ao Professor Dr. Luiz Glock pelo estímulo e ajuda na avaliação estatística.
- Ao Professor Dr. João Riboldi pela ajuda na avaliação estatística.
- À Bibliotecária Rosária Maria Lúcia Prenna Geremia pelo constante apoio na busca de novas referências e artigos.

SUMÁRIO

RESUMO	x
ABSTRACT	xii
1 INTRODUÇÃO	14
2 REFERENCIAL TEÓRICO	17
2.1 Células-tronco	17
2.2 Células-tronco mesenquimais	18
2.3 Marcadores de membrana	19
2.4 Células-tronco derivadas do tecido adiposo e fatores relacionados	20
3 OBJETIVO	24
4 PACIENTES E MÉTODOS	25
4.1 Delineamento	25
4.2 Pacientes	25
4.2.1 Critérios de inclusão.....	25
4.2.2 Critérios de exclusão.....	25
4.3 Obtenção de células-tronco adultas do tecido adiposo	26
4.4 Dissociação do tecido adiposo para obtenção de células-tronco adultas	27
4.5 Separação das células-tronco adultas	28

4.6 Caracterização das populações celulares	29
4.7 Análise estatística	29
4.8 Aspectos éticos.....	30
5 RESULTADOS	31
5.1 Concentração celular nas diferentes zonas doadoras	32
5.2 Idade e índice de massa corporal.....	34
6 DISCUSSÃO	35
7 CONCLUSÃO.....	39
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40
ANEXOS	45

LISTA DE ABREVIATURAS

ADAS - *Adipose-derived adult stem*

ADC - *Adipose tissue-derived stem cells*

ASC - *Adipose-derived stem cells*

CTMs - Células-tronco mesenquimais

DMEM - *Dulbecco's Modified Eagle Media*

DPBS - *Dulbecco's Phosphate Buffered Saline*

ep – Erro padrão

FBS – *Fetal bovine serum*

HSL PUCRS – Hospital São Lucas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

IMC – Índice de massa corporal

PLA – *Processed lipo-aspirate*

dp – Desvio padrão

rpm – Rotações por minuto

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Zona lipoaspirada e concentração celular	31
Tabela 2. Diferença entre médias nas diferentes zonas.	33

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Zonas doadoras de tecido adiposo.	27
Figura 2. Zonas de coleta e concentração celular.	32

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Carta de aprovação do Protocolo de Pesquisa pela Comissão Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde da PUCRS.	45
Anexo 2. Carta de aprovação do Protocolo de Pesquisa pelo Comitê de Ética e Pesquisa da PUCRS.	46
Anexo 3. Tabela de dados.	47
Anexo 4. Artigo publicado no <i>Plastic and Reconstructive Surgery</i>	49

RESUMO

INFLUÊNCIA DA ZONA DOADORA NA CONCENTRAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO DERIVADAS DO TECIDO ADIPOSEO EM MULHERES

Introdução: Recentemente, o tecido adiposo obtido através da lipoaspiração foi identificado como uma fonte alternativa de células-tronco adultas. A facilidade de obtenção e a abundância de material facilitam não só a pesquisa, mas principalmente a aplicação clínica destas células. Os estudos que tratam deste assunto não avaliam de forma precisa a existência ou não de diferença na concentração destas células nas diferentes possíveis zonas de coleta do corpo.

Objetivo: Avaliar a influência da zona doadora na concentração de células-tronco derivadas do tecido adiposo em mulheres.

Método: Estudo transversal prospectivo. Foram incluídos no estudo 25 pacientes com indicação de lipoaspiração em 4 ou mais zonas diferentes em um mesmo procedimento cirúrgico. Após a lipoaspiração seletiva, o material foi processado para a dissociação do tecido e extração das células-tronco adultas para posterior quantificação. Foram avaliadas as seguintes zonas de coleta: abdome superior, abdome inferior, zona

trocantérica, zona crural, joelho e flanco. A concentração celular obtida em cada zona foi comparada através de análise de variância para modelos mistos.

Resultados: Verificou-se diferença significativa na concentração celular obtida nas diferentes zonas doadoras. A concentração celular no abdome inferior foi superior às demais; porém, não apresentou diferença significativa em relação à zona crural.

Conclusão: O abdome inferior e a zona crural parecem ter maiores concentrações de células-tronco derivadas do tecido adiposo.

Palavras chaves: célula-tronco mesenquimal, lipoaspiração, engenharia de tecidos, tecido adiposo.

ABSTRACT

ADIPOSE-TISSUE DERIVED STEM CELLS: INFLUENCE OF DONOR SITE IN WOMEN

Introduction: Recently, adipose tissue harvested by liposuction has been identified as a source of adult stem cells. This material is abundant and easy to obtain, which facilitates the isolation of adult stem cells for not only research purposes but moreover clinical use. Knowing the concentration of these cells in different parts of the body is essential for the use of this material, but this information is not yet available.

Objective: The aim of this study was to determine the effect of liposuction donor site on the concentration of stem cells obtained from adipose tissue.

Method: A prospective cross-sectional study was conducted in 25 women with indication for liposuction in 4 or more different areas in the same procedure. After selective liposuction, the material was sent to the laboratory where it was processed for extraction of adult stem cells which were separated from the adipose tissue and quantified. The following harvest regions were evaluated: upper abdomen, lower abdomen, trochanteric region, crural region, knee and flank region. The cell

concentration obtained from each site was compared by analysis of variance for mixed models.

Results: A significant difference in cell concentration was found for the different harvest sites. The cell concentration in the lower abdomen was greater than in other areas, but no significant difference was found in relation to the crural region.

Conclusion: The lower abdomen and the inner thigh appear to have higher concentrations of adipose-derived stem cells.

Key words: mesenchymal stem cell; lipoaspirate; processed lipoaspirate cells; tissue engineering; adipose tissue.

1 INTRODUÇÃO

As pesquisas com células-tronco estão proporcionando um grande avanço no nosso conhecimento sobre como um organismo desenvolve-se a partir de uma única célula e como células saudáveis podem substituir células danificadas em organismos adultos.¹⁻³ O processo de substituição de células danificadas por células saudáveis é uma área de intensa pesquisa, tanto acadêmica quanto aplicada. Esta área da ciência, que é baseada no uso de células-tronco para o tratamento de doenças, é conhecida como medicina regenerativa.²

Do ponto de vista terapêutico, isto é, sua aplicação na regeneração de tecidos lesionados ou na engenharia de tecidos, as diferentes variedades de células-tronco apresentam vantagens e desvantagens. Devido às dificuldades práticas de obtenção de células-tronco embrionárias, e considerando os aspectos éticos e legais, inúmeros pesquisadores têm realizado seus estudos com células-tronco adultas, principalmente aquelas derivadas do estroma da medula óssea.³⁻⁶ Estudos recentes comprovaram que essa população celular também pode ser isolada do tecido adiposo coletado através de lipoaspiração.⁶⁻¹⁰ Alguns autores preferem não utilizar o termo células-tronco, em inglês “*stem cells*”, e referem-se a esse material como “*processed lipo-aspirate (PLA) cells*”^{6,11,12} ou “*adipose-derived adult stem (ADAS) cells*”.^{12,13} Outros termos utilizados na literatura são: *adipose tissue-derived stem cells (ADC)*, para o material lipoaspirado e processado; e

adipose-derived stem cells (ASC) quando as ADC são cultivadas.¹⁴ Neste estudo utilizaremos o termo “células-tronco derivadas do tecido adiposo”.

A facilidade de obtenção e a abundância de material estimulam a pesquisa e, principalmente, o uso clínico de células-tronco adultas extraídas do tecido adiposo. A capacidade de proliferação e diferenciação das células-tronco adultas derivadas de diversos tecidos do organismo, como o tecido adiposo, ainda não estão bem determinadas. Para que seja possível a utilização de células-tronco adultas de outras fontes, portanto, é de fundamental importância que se avalie a potencialidade dessas novas alternativas. Estas células-tronco devem apresentar características similares às obtidas da medula óssea no que se refere a sua proliferação, viabilidade e capacidade de diferenciação. No caso do tecido adiposo, em especial, não se sabe se há diferença quanto à concentração de células-tronco nas diferentes partes do corpo.

As lipoenxertias (aplicação do material lipoaspirado) têm sido realizadas na face em procedimentos estéticos¹⁵ e reparadores extensos, como atrofia complexa encontrada na Síndrome de Romberg.¹⁶ No contorno corporal, quantidades cada vez maiores de gordura têm sido injetadas com mínimas complicações e com resultados satisfatórios na região glútea.¹⁷ Não encontramos na literatura estudos analisando os resultados de lipoenxertias que avaliem as zonas doadoras. Observa-se, empiricamente, baseando-se em depoimentos de inúmeros cirurgiões plásticos, uma preferência pelo material coletado da face interna do joelho. Este fato gera o questionamento sobre a existência de alguma característica especial no material coletado nas diferentes zonas doadoras do corpo.

Um artigo publicado em 2008¹⁸ avaliou o uso de células-tronco derivadas do tecido adiposo em cirurgias estéticas de mama em 40 pacientes. Os resultados iniciais são promissores e aos autores acreditam que os mesmos sejam superiores ao uso da

lipoexertia tradicional sem aumentar riscos. Neste estudo não houve preocupação em descrever a zona corporal lipoaspirada para o processamento do material.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Células-tronco

As células-tronco são fundamentais, não somente para coordenar a formação dos órgãos desde a fase embrionária até o indivíduo adulto, mas também pelo seu papel fundamental na regeneração e reparo dos tecidos.³ Estas células têm como características principais a capacidade de auto-renovação e a diferenciação em múltiplas linhagens celulares. Embora existam inúmeros critérios propostos para definir células-tronco, elas basicamente devem ser células indiferenciadas, capazes de proliferação, auto-renovação, produção de inúmeras células funcionalmente diferenciadas e promoção da regeneração dos tecidos lesionados.¹⁹

Reconhecem-se três tipos principais de células-tronco, classificadas de acordo com o tecido de origem: (a) as células-tronco embrionárias, derivadas da camada interna de células do blastocisto; (b) as células-tronco presentes no sangue do cordão umbilical; e (c) as células-tronco derivadas do mesênquima, como as localizadas no estroma da medula óssea.

2.2 Células-tronco mesenquimais

A medula óssea é uma das fontes mais acessíveis e ricas em células-tronco mesenquimais (CTMs).⁵ As CTMs derivadas da medula óssea têm sido utilizadas experimentalmente na terapia gênica e aplicadas na engenharia de tecidos. A multipotencialidade das CTMs faz com que sejam excelentes para essas funções, podendo se diferenciar em adipócitos, condrócitos, fibroblastos e osteoblastos.^{5,6,12,20,21} A grande vantagem do uso destas células adultas está relacionada, além da fácil obtenção, ao fato de não enfrentar tantos problemas éticos e legais como os que ocorrem com células embrionárias.^{3-6,20} Contudo, a coleta de material da medula óssea em volume maior que 100 mililitros pode ser muito dolorosa e requerer anestesia geral ou bloqueio raquidiano.^{6,11,22} Além disso, trata-se de um material heterogêneo que proporciona poucas CTMs (aproximadamente 0,001% a 0,01% das células coletadas).^{4,6} A pequena quantidade de material pode exigir cultura destas células para que se obtenha quantidade suficiente para o uso clínico. Esse procedimento, além de caro, consome tempo e expõe o material ao risco de contaminação.⁶

Uma fonte alternativa de CTMs foi identificada no tecido adiposo aspirado em cirurgias plásticas (lipoaspirações), que permitem a extração de células-tronco com características semelhantes às obtidas da medula óssea.^{6,7,9-12,21,23-26} A grande vantagem do tecido adiposo como fonte de CTMs é a abundância do material disponível, que pode ser coletado em grande quantidade. Essas características tornam o tecido adiposo uma boa alternativa para o uso clínico de CTMs.^{11,25} A coleta deste material pode ser realizada com grande segurança, afinal mais de 400 mil lipoaspirações são realizadas anualmente apenas nos Estados Unidos, e com baixo índice de complicações.¹² Além da

possibilidade de obtenção de grande quantidade de material, a concentração de células-tronco no tecido adiposo pode ser 500 vezes maior do que a encontrada na medula óssea.¹²

De Ugarte,¹¹ em 2003, realizou o primeiro estudo de comparação entre populações de células-tronco adultas obtidas do tecido adiposo e da medula óssea, em um mesmo indivíduo. Avaliando cinco pacientes, não foram identificadas diferenças estatisticamente significativas quanto à aderência celular, cinética de crescimento, senescência celular, capacidade de diferenciação celular e eficiência de transdução genética. Contudo, além de avaliar um número pequeno de pacientes, não houve preocupação quanto ao gênero e à idade (7-71 anos).¹¹

2.3 Marcadores de membrana

As células-tronco adultas podem ser identificadas através do uso de anticorpos específicos para proteínas de membrana celular características de populações celulares por técnicas como a citometria de fluxo. Estudos descritos na literatura têm mostrado que as células da camada mononuclear obtidas de medula óssea, cordão umbilical e outros tecidos possuem tanto células-tronco hematopoiéticas quanto células-tronco mesenquimais. As células-tronco hematopoiéticas possuem como proteína de membrana característica o CD34, e dão origem a todas as células do tecido sanguíneo. Células-tronco mesenquimais e/ou células-tronco que expressam em suas membranas os marcadores CD105 (endoglina) e CD117 (c-kit) dão origem às células que irão formar os outros tecidos do organismo.²⁷⁻²⁹ Assim, é possível selecionar as populações celulares específicas para a regeneração do tecido de interesse.

Um estudo publicado por Zuk et al.²⁰ em 2002 caracterizou as células-tronco isoladas do tecido adiposo e as comparou com células da medula óssea por meio de

marcadores de membrana. Tanto as células originadas do tecido adiposo quanto da medula óssea foram positivas para CD13, CD29, CD44, CD71, CD90, CD105/SH2, SH3 e STRO-1. Não houve expressão dos marcadores CD14, CD16, CD31, CD34, CD45, CD56, CD61, CD62E, CD104 e CD106. Foi observada diferença na expressão do CD49d, presente apenas em células do tecido adiposo, e no CD106, observado apenas nas células da medula óssea.

2.4 Células-tronco derivadas do tecido adiposo e fatores relacionados

Da mesma forma que alguns fatores como idade, local da coleta e doença sistêmica influenciam na concentração das células-tronco obtidas da medula óssea, acredita-se que o mesmo possa ocorrer no material obtido do tecido adiposo.^{5,22}

Quanto à avaliação da influência da idade e do índice de massa corporal (IMC), Aust et al.,¹³ analisando pacientes do gênero feminino, descrevem uma correlação negativa entre a concentração celular obtida na lipoaspiração com o IMC, mas não encontram relação com a idade. Strem et al.³⁰ sugerem que a idade e o IMC influenciam no material obtido através da lipoaspiração, contudo não apresentam seus resultados. Avaliando o potencial osteogênico das CTMs derivadas do tecido adiposo de animais, Shi et al.³¹ não encontraram diferença desta variável quanto à idade.

Pouco se estudou quanto à influência da zona doadora do tecido adiposo na composição do material obtido. Strem et al.³⁰ acreditam que a zona de coleta influencie nos resultados da concentração celular, entretanto os autores não apresentam as zonas estudadas, apenas comentam sua experiência pessoal e citam esta informação baseada em dados próprios não publicados.

Peptan et al.³² compararam o potencial de diferenciação osteogênico do tecido adiposo visceral com o tecido subcutâneo em coelhos. A gordura visceral apresentou potencial osteogênico maior do que a subcutânea. A hipótese defendida pelos autores é de que essa diferença possa ser explicada pelas diferentes características histológicas dos materiais estudados. O tecido adiposo visceral é mais vascularizado e menos fibroso que o coletado no subcutâneo. Os autores acreditam que a grande quantidade de fibroblastos presentes no subcutâneo possa resultar na inibição da diferenciação celular após certo período de expansão.

Um estudo³³ realizado com humanos avaliou a vascularização do tecido adiposo no abdome inferior. A camada mais profunda do tecido adiposo mostrou-se significativamente mais irrigada que as camadas superficial e média. Quando avaliada a vascularização quanto à distribuição vertical e lateral, não se observou diferença significativa entre as áreas.

Características diferentes quanto à composição da gordura (saturadas, monossaturadas e polissaturadas) foram identificadas na avaliação de diferentes zonas do tecido adiposo (região abdominal, porção interna e externa da coxa) em mulheres.³⁴

Com o objetivo de verificar se a quantidade de produção óssea difere entre zonas de coleta distintas, Dragoo et al.³⁵ compararam o material obtido de lipoaspirações realizadas no abdome e nádegas de cinco pacientes com o material obtido da gordura infrapatelar de outro grupo de cinco pacientes. Não se encontrou diferença significativa entre as zonas estudadas quanto à produção óssea. A concentração celular média no material coletado no abdome e nádegas foi de $3,4 \times 10^5$ células/ml e na gordura infrapatelar foi de $5,5 \times 10^4$ células/ml. Os dados apresentados evidenciam uma grande variação dos resultados entre os pacientes, o que dificulta sua análise. Estes dados não podem ser pareados porque o

material estudado nas diferentes regiões não é obtido do mesmo paciente. Os autores não avaliam separadamente o material coletado no abdome e na nádega. Outro fator que pode ser questionado neste estudo é a diferença de média de idade entre os grupos de pacientes, sendo de 53 anos no dos lipoaspirados e de 73 anos no da gordura infrapatelar.

Oedayrajsingh-Varma et al.³⁶ avaliaram os efeitos do procedimento cirúrgico de coleta e do local no qual o mesmo foi realizado em relação ao rendimento da fração celular do estroma vascular. Tecido adiposo foi coletado da região abdominal (n=16), cintura (n=11) e mama (n=4) através de três diferentes técnicas cirúrgicas: ressecção, lipossucção tumescente e lipossucção assistida por ultrassonografia. Cada paciente forneceu apenas uma amostra de tecido. Foi observada uma grande variação na concentração celular entre os pacientes. Os resultados sugerem que a concentração de células viáveis independe da zona doadora e da técnica de coleta. No mesmo estudo, o material foi colocado em meio de cultura para diferenciação em linhagem óssea e cartilaginosa. Não se observou diferença do rendimento celular após a cultura do material quanto à zona de coleta. Os autores concluíram também que as três técnicas proporcionam um número similar e alto de células viáveis, contudo afetam as propriedades funcionais das células. A ressecção e a lipossucção tumescente apresentaram os melhores resultados quando comparados à lipossucção assistida por ultrassonografia. Este estudo avaliou um pequeno número de pacientes submetidos a diferentes técnicas de obtenção de material em diferentes sítios de coleta. Desta forma a comparação entre as zonas de coleta de tecido adiposo foi prejudicada, agravada pelo fato de haver uma grande variação na concentração celular entre os doadores.

Recentemente, Fraser et al.¹⁴ avaliaram a concentração celular em tecido adiposo obtido através de lipoaspiração do subcutâneo do abdome e do quadril em dez doadores.

Em cada paciente foram realizadas quatro coletas (abdome e quadril com utilização de sistema de seringa e lipossuctor). Nesta amostra observou-se grande variação nos resultados obtidos entre os doadores. Cada paciente forneceu quatro amostras de material e pôde-se realizar uma análise pareada. O material coletado do quadril apresentou maior concentração de células-tronco derivadas do tecido adiposo do que o obtido no abdome, contudo essa diferença foi pequena e estatisticamente significativa apenas quando utilizado o lipossuctor ($p < 0,04$). As amostras foram cultivadas e observou-se maior rendimento no material coletado do quadril quando comparado ao obtido do abdome.

Como podemos verificar, poucos foram os autores^{14,30,35,37} que valorizaram a influência da zona doadora de tecido adiposo para o processamento de células-tronco. Com exceção do estudo de Fraser et al.,¹⁴ a metodologia utilizada nas pesquisas que avaliam as zonas doadoras apresentam falhas que não permitem conclusões mais definitivas quanto à existência de diferentes concentrações de CTMs nas diferentes zonas do corpo.

3 OBJETIVO

Quantificar a concentração de células-tronco adultas derivadas do tecido adiposo obtido de diferentes regiões do corpo em uma população feminina adulta.

4 PACIENTES E MÉTODOS

4.1 Delineamento

Estudo transversal prospectivo.

4.2 Pacientes

Foram selecionados para o estudo 25 pacientes consecutivas que realizaram lipoaspiração no período de abril a julho de 2007, operadas por uma equipe de cirurgia plástica e que preencheram os seguintes critérios:

4.2.1 Critérios de inclusão

- Gênero feminino;
- Idade entre 21 e 40 anos;
- Lipoaspiração de ao menos 4 zonas diferentes no mesmo procedimento com um volume mínimo de 10 ml de gordura por segmento aspirado.

4.2.2 Critérios de exclusão

As pacientes que apresentaram pelo menos um dos critérios abaixo descritos foram excluídas.

- Patologia hematológica;
- Quimioterapia prévia;
- Radioterapia prévia;
- Uso crônico de corticóide;
- Diabete melito;
- Doenças do tecido conjuntivo;
- Patologia do tecido gorduroso.

4.3 Obtenção de células-tronco adultas do tecido adiposo

Sob anestesia geral, após anti-sepsia habitual com clorexidine, sucedeu-se a lipoaspiração das zonas corporais definidas pelo planejamento pré-cirúrgico. A lipoaspiração foi efetuada na camada profunda do panículo adiposo pela técnica tumescente, que consiste na infiltração da camada gordurosa com uma solução anestésica e vasoconstritora diluída em soro fisiológico para provocar distensão da pele e menor sangramento. Essa solução era composta por 1.000 ml de solução fisiológica 0,9%, 10 ml de Ropivacaína 7,5% e Adrenalina diluída em uma concentração de 1:700.000. A lipoaspiração foi realizada com um sistema de vácuo e com cânulas de 3, 3,5 e 4 mm de diâmetro e 15 a 20 cm de comprimento. Após a lipoaspiração de cada zona, o material coletado foi separado em frascos de 100 ml dos quais 10 ml do sobrenadante eram coletados após um período de 20 minutos. Esse material foi levado ao laboratório para o processamento celular.

Diferenciaram-se os seguintes sítios de coleta: abdome superior, abdome inferior, zona trocantérica, zona crural, joelho (face interna) e flanco (Figura 1). O material lipoaspirado de outras regiões do corpo não foi analisado. É importante ressaltar que não

foram retiradas células de todos os sítios de coleta em todos os pacientes, apenas das zonas lipoaspiradas em cada paciente conforme definido no plano cirúrgico.

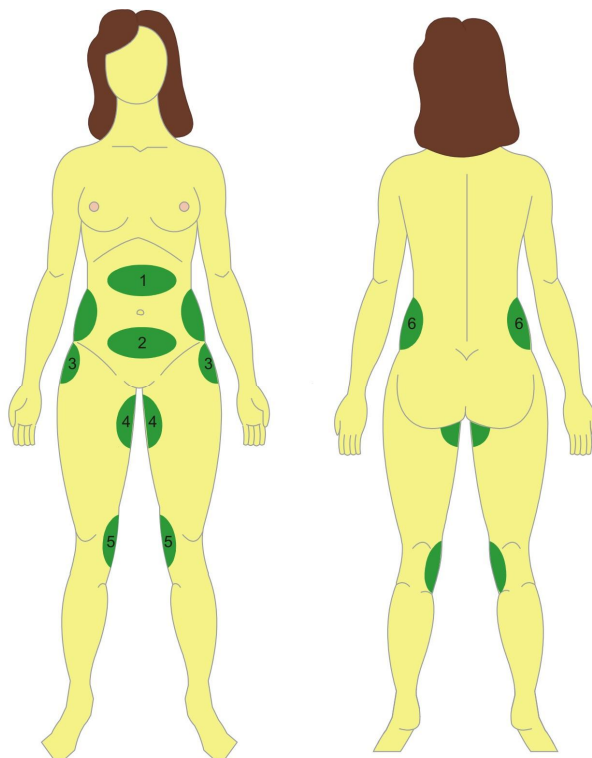


Figura 1. Zonas doadoras de tecido adiposo.

Legenda: 1- abdome superior, 2- abdome inferior, 3- zona trocântérica, 4- zona crural, 5- joelho; 6- flanco.

4.4 Dissociação do tecido adiposo para obtenção de células-tronco adultas

A gordura aspirada foi levada ao laboratório onde se processou a extração das células-tronco adultas. Dez mililitros de tecido adiposo de cada zona foram divididos em dois tubos e lavados com 40 ml de DPBS (*Dulbecco's Phosphate Buffered Saline*; Invitrogen Corp.) contendo 2% (v/v) de soro fetal bovino (FBS; Invitrogen Corp. Carlsbad, CA - USA) para retirada das hemácias. A suspensão foi centrifugada a 450 g por 5 minutos. O tecido adiposo foi transferido para um novo tubo onde foram acrescentados

0,015% (p/v) de colagenase (Sigma Co., St. Louis, MO, USA) diluída em DPBS em um total de 50 ml. O tubo foi colocado em um agitador orbital e incubado a 37°C por 45 minutos até dissociação completa do tecido. A colagenase foi inativada com meio de cultura DMEM (Invitrogen Corp. Carlsbad, CA - USA) contendo 10% (v/v) de FBS (Invitrogen Corp. Carlsbad, CA - USA) e a solução foi dividida em dois tubos. As células foram centrifugadas a 1.200 g por 10 minutos e o sobrenadante descartado. As células foram ressuspensas com 10 ml de DPBS contendo 10% (v/v) de FBS, seguido de nova centrifugação para lavagem.

4.5 Separação das células-tronco adultas

As células foram separadas, por centrifugação, em gradiente de densidade usando Histopaque®-1077 (Sigma Diagnostics, USA). Para tanto, as células foram ressuspensas com 4 ml de meio de cultura DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Media*; Invitrogen, USA), colocadas em 2 ml de Histopaque® e centrifugadas em uma centrífuga de alto poder (MSE Mistral 2000, USA) a 400 g, durante 30 minutos. A camada de células mononucleares derivada deste processo, contendo as células-tronco, foi retirada e lavada com 10 ml de DPBS (*Dulbecco's Phosphate Buffered Saline*; Invitrogen, USA) e centrifugada a 1.500 rotações por minuto (rpm), por 3 minutos. As células foram ressuspensas com 500 µl de DMEM e quantificadas. A viabilidade foi avaliada pelo método de exclusão com azul-tripán em hemocitômetro (Optik Labor, USA), que diferencia as células saudáveis das inviáveis.

4.6 Caracterização das populações celulares

A caracterização das populações celulares presentes na suspensão de células foi realizada pela técnica de citometria de fluxo com os anticorpos anti-CD34, anti-CD117, anti-CD105 e anti-CD45, anti-CD34/anti-CD117 e anti-CD45/anti-CD105 (Caltag Laboratories, Burlingame, CA, USA) em um citômetro de fluxo FACScalibur (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, USA) em uma alíquota de 100 µl onde foi acrescentado 10 µl de cada anticorpo. A solução foi incubada à temperatura ambiente por 30 minutos no escuro. Após o período de incubação, a amostra foi centrifugada a 200 g por 5 minutos e o sobrenadante foi descartado. A amostra foi lavada com 2 ml de PBS (PBS, 0,1% de azida sódica e 1% de FBS) por centrifugação a 200 g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas com 500 µl de PBS. A amostra foi analisada em até 8 horas.

4.7 Análise estatística

As variáveis descritivas foram avaliadas através de média e desvio padrão. Foi utilizada análise de variância para (ANOVA) para modelos mistos,³⁷ considerando-se o efeito da zona doadora como fixo e o efeito de pacientes como aleatório. As complementações, no caso de identificadas diferenças significativas entre zonas pelo teste F da ANOVA a 5%, foram feitas utilizando-se o teste de Tukey-Kramer a 5%. O estudo de adequação do modelo foi procedido através da análise dos resíduos e da verificação de normalidade através do teste de Kolmogorov-Smirnov.

Todas as análises foram executadas no SAS versão 9,1 (SAS Institute, Inc. SAS statistical software, release 9,1. Cary, NC:SAS Institute, Inc, 2002-2003).

4.8 Aspectos éticos

O estudo foi aprovado pela Comissão Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde da PUCRS (Anexo 1) e pelo Comitê de Ética e Pesquisa da mesma instituição (Anexo 2).

5 RESULTADOS

Foram avaliadas 25 pacientes com idade de $30,7 \pm 4,3$ anos e o IMC de $26,2 \pm 4,4$ Kg/m². Destas, 23 pacientes foram submetidas à lipoaspiração em cinco zonas distintas do corpo e duas em quatro. As células obtidas do tecido adiposo foram positivas para CD105, CD117, CD34+117 e CD45+105. Não se observou expressão dos marcadores CD34 e CD45. As zonas doadoras de material e as respectivas concentrações celulares obtidas são apresentadas na Tabela 1 e na Figura 2.

Tabela 1. Zona lipoaspirada e concentração celular.

	n	Concentração celular *
Abdome inferior	25	$7,92 \pm 0,59$
Abdome superior	23	$1,49 \pm 0,60$
Joelho	23	$7,13 \pm 1,17$
Zona Crural	19	$7,70 \pm 0,70$
Flanco	19	$0,73 \pm 0,60$
Zona Trocântérica	14	$1,74 \pm 0,80$

F=405,93; p<0.001; * Média (ep) x10⁶ células/ml

(x10⁶ células/ml)

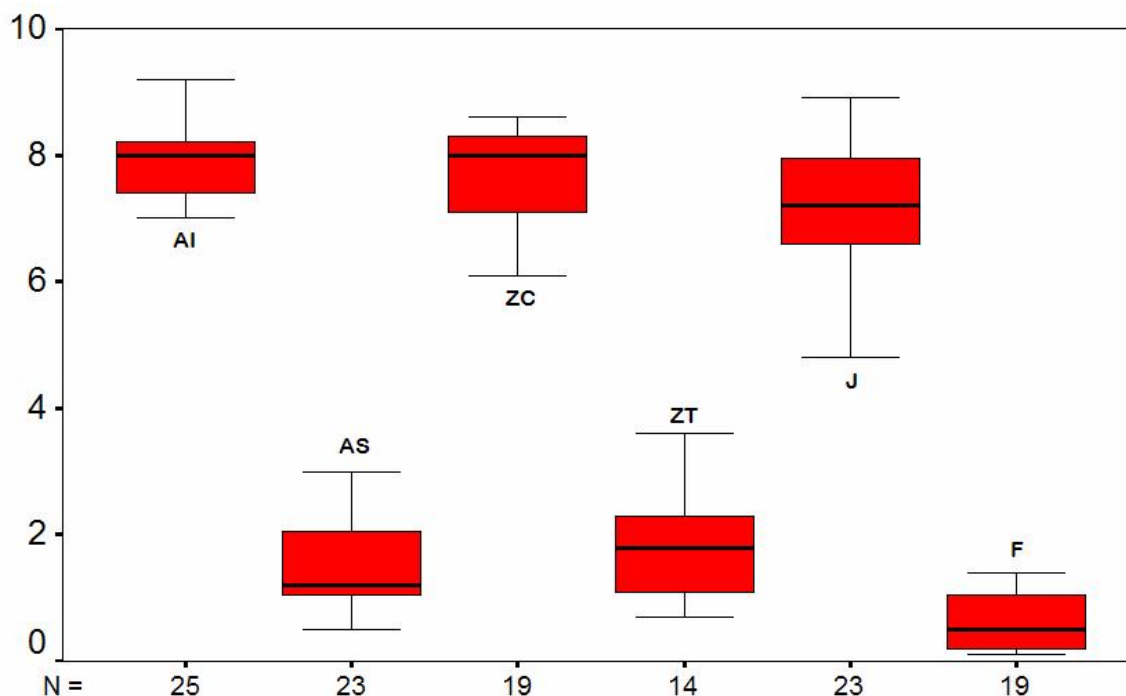


Figura 2. Zonas de coleta e concentração celular.

Legenda: AI –abdome inferior, AS –abdome superior, ZC –zona crural, ZT –zona trocântérica, J–joelho;

F –flanco.

5.1 Concentração celular nas diferentes zonas doadoras

Verificou-se diferença estatisticamente significativa ($F=405,93$; $p<0.001$) na concentração celular obtida nas diferentes zonas de coleta. A concentração celular no abdome inferior é superior às demais, exceto à zona crural. A zona crural e a zona do joelho apresentam concentrações superiores às demais zonas (exceto ao abdome inferior) e não diferem entre si. O abdome superior e a zona trocântérica não apresentaram diferença na concentração celular e apresentaram valores superiores aos obtidos no flanco. A diferença entre as médias nas diferentes zonas foi calculada através do teste de Tukey-Kramer e é apresentada na Tabela 2.

Tabela 2. Diferença entre médias nas diferentes zonas.

ZONA	ZONA	P
Abdome inferior	Abdome superior	<0,0001
Abdome inferior	Zona Crural	0,9380
Abdome inferior	Zona Trocantérica	<0,0001
Abdome inferior	Joelho	0,0091
Abdome inferior	Flanco	<0,0001
Abdome superior	Zona Crural	<0,0001
Abdome superior	Zona Trocantérica	0,9261
Abdome superior	Joelho	<0,0001
Abdome superior	Flanco	0,0258
Zona Crural	Zona Trocantérica	<0,0001
Zona Crural	Joelho	0,1914
Zona Crural	Flanco	<0,0001
Zona Trocantérica	Joelho	<0,0001
Zona Trocantérica	Flanco	0,0045
Joelho	Flanco	<0,0001

Quanto à adequação do modelo de ANOVA procedendo-se a análise de resíduos. Através dos gráficos dos resíduos versus valores ajustados, não se verifica nenhum indicador de variância heterogênea. No gráfico de probabilidade normal dos resíduos verifica-se uma aderência em relação à linha reta indicando aderência à normalidade, o que é comprovado pelo teste de Kolmogorov-Smirnov ($p > 0,150$).

5.2 Idade e índice de massa corporal

A idade e o IMC foram comparados com a concentração celular obtida em todas as pacientes, independente do local de coleta do material. Não se verificou influência da idade ($p=0,684$) ou do IMC ($p=0,570$) na concentração celular.

6 DISCUSSÃO

Estratégias de tratamentos baseadas no uso de células-tronco têm o potencial de revolucionar a prática da medicina, tendo em vista a possibilidade de oferecer opções terapêuticas para pacientes com doenças frequentemente fatais como infarto do miocárdio e acidente vascular cerebral.²⁹ Objetivos como este estimulam cada vez mais pesquisas nesta área. Em um estudo³⁸ realizado no Hospital São Lucas da PUCRS, foram avaliados pacientes submetidos a tratamento cirúrgico de lesão de nervo mediano ou ulnar. Em um grupo de pacientes (série histórica) utilizou-se um cateter entre a extremidade proximal e distal do nervo, e em outro grupo realizou-se o mesmo procedimento com a injeção de células-tronco oriundas da medula óssea dentro do cateter. Os resultados funcionais e sensitivos foram superiores no grupo que recebeu células-tronco. Quando avaliados isoladamente, observou-se que quanto maior a concentração de células-tronco utilizada, melhor foi o resultado. Estes achados sugerem que a concentração celular é um fator importante no resultado terapêutico com o uso de células-tronco.

A principal limitação dos estudos^{35,36} que tentaram avaliar a importância da zona de coleta em relação às células-tronco derivadas do tecido adiposo esteve centrada na falta de um controle adequado. Para que se possa concluir que alguma zona doadora possa ou não ter uma maior concentração de células-tronco é necessário que as coletas sejam realizadas

nos mesmos indivíduos. Na medida que os pesquisadores^{14,35,36} descrevem uma grande variação da concentração celular entre os doadores independente da zona de coleta, não é possível comparar os resultados obtidos em diferentes locais não se avaliando o mesmo paciente.

Encontramos na literatura apenas um estudo¹⁴ com o objetivo principal de comparar a concentração de células-tronco em diferentes zonas doadoras do tecido adiposo. O material avaliado foi coletado da região do quadril e do abdome. Os autores avaliaram apenas dez pacientes, mas tiveram o cuidado de fazer uma análise pareada, de forma a evitar a comparação entre diferentes zonas doadoras em diferentes pacientes. A concentração de células-tronco foi maior na região do quadril em relação à abdominal. Não houve preocupação em detalhar a zona abdominal lipoaspirada, não sendo possível saber se foi utilizada a porção superior ou inferior. É descrita uma grande variação nos resultados obtidos entre os doadores, o que reforça a importância da avaliação pareada.

Não é possível comparar nossos resultados aos descritos por Fraser et al.,¹⁴ principalmente devido à dificuldade de definir com exatidão os locais de coleta utilizados. Obtivemos valores cinco vezes maiores na concentração celular no material coletado no abdome inferior quando comparado ao abdome superior. Desta forma, os autores¹⁴ precisariam especificar de que região do abdome e em que local específico do quadril foram realizadas as coletas de tecido adiposo.

No presente estudo, as diferenças de concentração observadas entre as múltiplas zonas de coleta, apresentada na Tabela 1, foram de grande proporção. Comparando o material obtido no abdome inferior com o oriundo do flanco, observamos uma concentração média aproximadamente dez vezes maior no abdome inferior. O abdome inferior e a zona crural apresentaram valores superiores às demais zonas quanto à

concentração celular, e podem ser a primeira escolha como sítios doadores de células-tronco derivadas do tecido adiposo.

No nosso estudo, as diversas amostras foram coletadas dos mesmos pacientes e comparadas entre si através do teste de variância para modelos mistos, que considera o efeito de “zona” como fixo. Desta forma, existe uma verificação da diferença de concentração nas zonas em cada indivíduo avaliado. Essa ferramenta estatística elimina o viés de compararem-se apenas as médias obtidas em cada região, o que poderia influenciar nos resultados devido a uma possível variação entre os doadores.

Acreditamos, da mesma forma que outros autores,^{5,13,14,22,30,31} que fatores como idade e IMC são variáveis que possam influenciar na concentração das células-tronco derivadas do tecido adiposo, assim como influenciam no material obtido da medula óssea. Nas pacientes avaliadas não verificamos influência desses fatores na concentração celular, o que pode ser justificado por ser tratar de uma população homogênea quanto à idade e ao IMC.

Pouco existe na literatura sobre as possíveis causas de encontrarmos diferenças no material coletado nas diferentes zonas de coleta do subcutâneo. Detalhes da vascularização³³ e da composição³⁴ do tecido adiposo podem influenciar nos resultados obtidos.

Alguns fatores da metodologia desta pesquisa podem ser questionados, como a utilização de cânulas de diferentes calibres, a utilização de solução vasoconstritora para a técnica tumescente e a profundidade da coleta da amostra. Acreditamos que a coleta de material para o processamento de células-tronco deva ser feita com a maior segurança possível, utilizando uma técnica já consagrada. Neste estudo, nenhuma rotina cirúrgica foi modificada em virtude da pesquisa. Desta forma, utilizou-se a cânula com calibre julgado mais adequado para cada tempo cirúrgico, assim como a quantidade de infiltração

necessária para cada local a ser lipoaspirado. Tendo em vista a experiência dos cirurgiões plásticos na realização de lipoaspiração, acreditamos que sejam estes, utilizando a forma *standard* de lipoaspiração, que devam fazer coleta deste material para a terapia celular.

Nosso estudo avaliou apenas a concentração de células-tronco derivadas do tecido adiposo nas diversas regiões. Os resultados obtidos através da citometria de fluxo são compatíveis com os descritos na literatura para essas células.²⁰ Acreditamos que as zonas doadoras que forneceram mais células devam ser eleitas como local de coleta para a prática clínica, contudo isso só será confirmado após submeter esse material a diferentes meios de cultura e se observar como se diferenciam nas diversas linhagens celulares.

Esta pesquisa foi realizada apenas com pacientes do gênero feminino por representarem a população que usualmente é submetida à lipoaspiração em múltiplas zonas. No estudo conduzido por Fraser et al.¹⁴ 90% dos pacientes avaliados eram mulheres. Um estudo semelhante com homens é necessário para avaliar se esses resultados se repetem no gênero masculino.

7 CONCLUSÃO

Foi verificada diferença significativa na concentração de células-tronco derivadas do tecido adiposo nas diferentes zonas doadoras em mulheres. O abdome inferior e a zona crural apresentaram as maiores concentrações de células-tronco.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Daley GQ, Goodell MA, Snyder EY. Realistic prospects for stem cell therapeutics. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)*. 2003: 398-418.
2. Fodor WL. Tissue engineering and cell based therapies, from the bench to the clinic: the potential to replace, repair and regenerate. *Reprod Biol Endocrinol*. 2003; 1: 102.
3. Tohill M, Terenghi G. Stem-cell plasticity and therapy for injuries of the peripheral nervous system. *Biotechnol Appl Biochem*. 2004; 40: 17-24.
4. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999; 284: 143-7.
5. Tuan RS, Boland G, Tuli R. Adult mesenchymal stem cells and cell-based tissue engineering. *Arthritis Res Ther*. 2003; 5: 32-45.
6. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng*. 2001; 7: 211-28.
7. Erickson GR, Gimble JM, Franklin DM, Rice HE, Awad H, Guilak F. Chondrogenic potential of adipose tissue-derived stromal cells in vitro and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002; 290: 763-9.

8. Martinez-Estrada OM, Munoz-Santos Y, Julve J, Reina M, Vilaro S. Human adipose tissue as a source of Flk-1+ cells: new method of differentiation and expansion. *Cardiovasc Res.* 2005; 65: 328-33.
9. Safford KM, Hicok KC, Safford SD, et al. Neurogenic differentiation of murine and human adipose-derived stromal cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002; 294: 371-9.
10. Mizuno H, Zuk PA, Zhu M, Lorenz HP, Benhaim P, Hedrick MH. Myogenic differentiation by human processed lipoaspirate cells. *Plast Reconstr Surg.* 2002; 109: 199-209; discussion 10-1.
11. De Ugarte DA, Morizono K, Elbarbary A, et al. Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow. *Cells Tissues Organs.* 2003; 174: 101-9.
12. Fraser JK, Wulur I, Alfonso Z, Hedrick MH. Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology. *Trends Biotechnol.* 2006; 24: 150-4.
13. Aust L, Devlin B, Foster SJ, et al. Yield of human adipose-derived adult stem cells from liposuction aspirates. *Cytotherapy.* 2004; 6: 7-14.
14. Fraser J, Wulur I, Alfonso Z, Zhu M, Wheeler E. Differences in stem and progenitor cell yield in different subcutaneous adipose tissue depots. *Cytotherapy.* 2007; 9: 459-67.
15. Guerrerosantos J. Simultaneous rhytidoplasty and lipoinjection: a comprehensive aesthetic surgical strategy. *Plast Reconstr Surg.* 1998; 102: 191-9.
16. Vaienti L, Soresina M, Menozzi A. Parascapular free flap and fat grafts: combined surgical methods in morphological restoration of hemifacial progressive atrophy. *Plast Reconstr Surg.* 2005; 116: 699-711.

17. Cardenas-Camarena L, Lacouture AM, Tobar-Losada A. Combined gluteoplasty: liposuction and lipoinjection. *Plast Reconstr Surg.* 1999; 104: 1524-31; discussion 32-3.
18. Yoshimura K, Sato K, Aoi N, Kurita M, Hirohi T, Harii K. Cell-assisted lipotransfer for cosmetic breast augmentation: supportive use of adipose-derived stem/stromal cells. *Aesthetic Plast Surg.* 2008; 32: 48-55; discussion 56-7.
19. Loeffler M, Potten CS. Stem cells and cellular pedigrees - a conceptual introduction. In: *Stem cells.* Potten CS, editor. London: Academic Press; 1997. p. 1-27.
20. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell.* 2002; 13: 4279-95.
21. Mizuno H, Hyakusoku H. Mesengenic potential and future clinical perspective of human processed lipoaspirate cells. *J Nippon Med Sch.* 2003; 70: 300-6.
22. Moseley TA, Zhu M, Hedrick MH. Adipose-derived stem and progenitor cells as fillers in plastic and reconstructive surgery. *Plast Reconstr Surg.* 2006; 118: 121S-28S.
23. Halvorsen YC, Wilkison WO, Gimble JM. Adipose-derived stromal cells - their utility and potential in bone formation. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2000; 24 Suppl 4: S41-4.
24. Patrick CW, Jr. Adipose tissue engineering: the future of breast and soft tissue reconstruction following tumor resection. *Semin Surg Oncol.* 2000; 19: 302-11.
25. Romanov YA, Darevskaya AN, Merzlikina NV, Buravkova LB. Mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue: isolation, characterization, and differentiation potentialities. *Bull Exp Biol Med.* 2005; 140: 138-43.

26. 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; 189: 54-63.
27. Bang OY, Lee JS, Lee PH, Lee G. Autologous mesenchymal stem cell transplantation in stroke patients. *Ann Neurol.* 2005; 57: 874-82.
28. Barry FP, Boynton RE, Haynesworth S, Murphy JM, Zaia J. The monoclonal antibody SH-2, raised against human mesenchymal stem cells, recognizes an epitope on endoglin (CD105). *Biochem Biophys Res Commun.* 1999; 265: 134-9.
29. Horwitz EM. Stem cell plasticity: the growing potential of cellular therapy. *Arch Med Res.* 2003; 34: 600-6.
30. Strem BM, Hicok KC, Zhu M, et al. Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells. *Keio J Med.* 2005; 54: 132-41.
31. Shi YY, Nacamuli RP, Salim A, Longaker MT. The osteogenic potential of adipose-derived mesenchymal cells is maintained with aging. *Plast Reconstr Surg.* 2005; 116: 1686-96.
32. Peptan IA, Hong L, Mao JJ. Comparison of osteogenic potentials of visceral and subcutaneous adipose-derived cells of rabbits. *Plast Reconstr Surg.* 2006; 117: 1462-70.
33. El-Mrakby HH, Milner RH. Bimodal distribution of the blood supply to lower abdominal fat: histological study of the microcirculation of the lower abdominal wall. *Ann Plast Surg.* 2003; 50: 165-70.
34. Phinney SD, Stern JS, Burke KE, Tang AB, Miller G, Holman RT. Human subcutaneous adipose tissue shows site-specific differences in fatty acid composition. *Am J Clin Nutr.* 1994; 60: 725-9.

35. Dragoo JL, Lieberman JR, Lee RS, et al. Tissue-engineered bone from BMP-2-transduced stem cells derived from human fat. *Plast Reconstr Surg*. 2005; 115: 1665-73.
36. Oedayrajsingh-Varma MJ, van Ham SM, Knippenberg M, et al. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cell yield and growth characteristics are affected by the tissue-harvesting procedure. *Cytotherapy*. 2006; 8: 166-77.
37. Brown H, Prescott R. *Applied Mixed Models in Medicine*, 2 ed. New York: John Wiley; 2006.
38. Braga-Silva J, Gehlen D, Padoin AV, Machado DC, Garicochea B, Costa da Costa J. Can local supply of bone marrow mononuclear cells improve the outcome from late tubular repair of human median and ulnar nerves? *J Hand Surg (BR)*. 2008; in press.

ANEXOS

Anexo 1. Carta de aprovação do Protocolo de Pesquisa pela Comissão Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde da PUCRS.



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
FACULDADE DE MEDICINA
PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE

649/06-PG

Porto Alegre, 15 de setembro de 2006.

Ao Pós-Graduando
Alexandre Vontobel Padoin
N/Faculdade

Prezado Pós-Graduando:

Informamos que a proposta de tese intitulada "Localização, qualificação e caracterização de células tronco adultas derivadas de tecido adiposo humano" **foi aprovada** pela comissão Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde.

Informamos que a mesma deve ser encaminhada ao Comitê de Ética em Pesquisa através do CIDAPE, 2º andar do HSL. Em anexo, copia da avaliação.

Atenciosamente .

Profa. Dr. Magda Lahorgue Nunes
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação
em Medicina e Ciências da Saúde

C/c: Prof. Dr. Jefferson Luis Braga da Silva

PUCRS

Campus Central
Av. Ipiranga, 6690 - P. 60 - 3º andar - CEP 90610-000
Porto Alegre - RS - Brasil
Fone: (51) 3320-3318 - Fax (51) 3320-3316
E-mail: medicina-pg@pucrs.br
www.pucrs.br/medicina

Anexo 2. Carta de aprovação do Protocolo de Pesquisa pelo Comitê de Ética e Pesquisa da PUCRS.



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP - PUCRS



Ofício 544/06-CEP

Porto Alegre, 22 de maio de 2006.

Senhor(a) Pesquisador(a)

O Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS apreciou e aprovou seu protocolo de pesquisa registro CEP 06/03088, intitulado:: **"Localização, quantificação e caracterização de células tronco adultas derivadas de tecido adiposo humano"**.

Sua investigação está autorizada a partir da presente data.

Relatórios parcial e final da pesquisa devem ser encaminhados a este CEP.

Atenciosamente,

Prof. Dr. José Roberto Goldim
COORDENADOR DO CEP-PUCRS

Ilmo(a) Sr(a)
Dr(a) Jefferson Luis Braga da Silva
N/Universidade

Anexo 3. Tabela de dados.

PAC	ZONA	IDADE	IMC	CONC	PAC	ZONA	IDADE	IMC	CONC
1	abd inf	26	22,7	7,2	9	abd sup	30	25,5	1
1	abd sup	26	22,7	3	9	crural	30	25,5	8,3
1	crural	26	22,7	8	9	joelho	30	25,5	7,9
1	trocant	26	22,7	2,2	9	dorso	30	25,5	0,2
1	joelho	26	22,7	5,5	10	abd inf	25	24,0	7,4
2	abd inf	28	34,0	7,3	10	abd sup	25	24,0	2
2	abd sup	28	34,0	1,5	10	crural	25	24,0	7
2	crural	28	34,0	8,3	10	trocant	25	24,0	2,4
2	trocant	28	34,0	1,8	10	joelho	25	24,0	4,5
2	joelho	28	34,0	6,4	11	abd inf	21	30,5	8
3	abd inf	28	21,4	8,3	11	abd sup	21	30,5	1,1
3	abd sup	28	21,4	1,2	11	crural	21	30,5	8,1
3	trocant	28	21,4	1,8	11	trocant	21	30,5	1,1
3	joelho	28	21,4	7,2	11	joelho	21	30,5	7,8
3	dorso	28	21,4	2,4	12	abd inf	29	24,6	8,3
4	abd inf	37	22,2	7,9	12	abd sup	29	24,6	1,2
4	crural	37	22,2	8,3	12	trocant	29	24,6	0,8
4	trocant	37	22,2	2,1	12	joelho	29	24,6	6,2
4	joelho	37	22,2	4,8	12	dorso	29	24,6	1,4
4	dorso	37	22,2	1	13	abd inf	32	25,1	8
5	abd inf	34	20,1	7,2	13	abd sup	32	25,1	1,2
5	abd sup	34	20,1	1,3	13	crural	32	25,1	8,3
5	crural	34	20,1	7,9	13	joelho	32	25,1	7,8
5	trocant	34	20,1	1,1	13	dorso	32	25,1	1
5	dorso	34	20,1	0,2	14	abd inf	33	23,9	8,2
6	abd inf	35	27,6	8,2	14	abd sup	33	23,9	1,5
6	abd sup	35	27,6	1,5	14	crural	33	23,9	8,1
6	crural	35	27,6	7,1	14	trocant	33	23,9	1,1
6	joelho	35	27,6	7,8	14	dorso	33	23,9	1,2
6	dorso	35	27,6	0,5	15	abd inf	37	26,6	7,8
7	abd inf	36	37,6	8,8	15	abd sup	37	26,6	2,5
7	abd sup	36	37,6	1	15	crural	37	26,6	8,3
7	joelho	36	37,6	6,8	15	joelho	37	26,6	7,1
7	dorso	36	37,6	0,1	15	dorso	37	26,6	0,5
8	abd inf	32	20,5	7,3	16	abd inf	31	33,3	8,9
8	abd sup	32	20,5	2,1	16	abd sup	31	33,3	1
8	crural	32	20,5	7,1	16	joelho	31	33,3	8,8
8	joelho	32	20,5	8,1	16	dorso	31	33,3	0,1
8	dorso	32	20,5	0,9	17	abd inf	33	23,8	8,5
9	abd inf	30	25,5	8,1	17	abd sup	33	23,8	2,1

PAC	ZONA	IDADE	IMC	CONC	PAC	ZONA	IDADE	IMC	CONC
17	crural	33	23,8	7,5	21	trocant	26	26,8	2,3
17	joelho	33	23,8	8,1	21	joelho	26	26,8	5,9
17	dorso	33	23,8	0,4	22	abd inf	22	29,7	7,4
18	abd inf	32	24,7	8,1	22	abd sup	22	29,7	1,1
18	abd sup	32	24,7	1	22	crural	22	29,7	8,6
18	crural	32	24,7	7,3	22	trocant	22	29,7	2,3
18	joelho	32	24,7	8,9	22	joelho	22	29,7	8
18	dorso	32	24,7	0,2	23	abd inf	31	26,3	7
19	abd inf	32	20,5	7,4	23	abd sup	31	26,3	1,2
19	abd sup	32	20,5	2,1	23	trocant	31	26,3	0,7
19	crural	32	20,5	6,9	23	joelho	31	26,3	6,9
19	joelho	32	20,5	6,8	23	dorso	31	26,3	1,3
19	dorso	32	20,5	1,1	24	abd inf	33	31,2	8,2
20	abd inf	30	25,5	8,2	24	crural	33	31,2	6,1
20	abd sup	30	25,5	1	24	trocant	33	31,2	3,6
20	crural	30	25,5	8,3	24	joelho	33	31,2	7,8
20	joelho	30	25,5	6,9	24	dorso	33	31,2	1
20	dorso	30	25,5	0,2	25	abd inf	35	27,3	9,2
21	abd inf	26	26,8	7,1	25	abd sup	35	27,3	0,5
21	abd sup	26	26,8	2,1	25	trocant	35	27,3	1,1
21	crural	26	26,8	6,8	25	joelho	35	27,3	8,2
					25	dorso	35	27,3	0,2

Sources of Processed Lipoaspirate Cells: Influence of Donor Site on Cell Concentration

Alexandre Vontobel Padoin, M.D.
 Jefferson Braga-Silva, M.D., Ph.D.
 Pedro Martins, M.D.
 Katia Rezende, M.D.
 Antonio Roberto da Rosa Rezende, M.D.
 Bianca Grechi, M.D.
 Daniel Gehlen, M.D.
 Denise Cantarelli Machado, Ph.D.

Porto Alegre, Brazil

Background: Recently, adipose tissue harvested by liposuction has been identified as a source of processed lipoaspirate cells. The aim of this study was to determine the concentration of processed lipoaspirate cells in adipose tissue obtained by liposuction from different harvest areas in women.

Methods: A prospective cross-sectional study was conducted in 25 women in whom liposuction in four or more different zones in the same procedure was indicated. After selective liposuction, the material was sent to the laboratory, where it was processed for extraction of processed lipoaspirate cells, which were separated from the adipose tissue, quantified, and characterized through determination of c-kit expression. The following harvest regions were evaluated: upper abdomen, lower abdomen, trochanteric region, inner thigh, knee, and flank. The cell concentration obtained at each site was compared by analysis of variance for mixed models.

Results: A significant difference was found for cell concentration obtained at the different harvest sites. The cell concentration in the lower abdomen was greater than in other areas, but no significant difference was found in relation to the inner thigh.

Conclusions: The lower abdomen and the inner thigh may have higher processed lipoaspirate cell concentrations. These sites may turn out to be better sources of adult mesenchymal stem cells. (*Plast. Reconstr. Surg.* 122: 614, 2008.)

Mesenchymal stem cells obtained from bone marrow have been used experimentally in gene therapy and applied in tissue engineering. The pluripotentiality of mesenchymal stem cells makes them an excellent choice for these uses, where they can differentiate into adipocytes, chondrocytes, fibroblasts, and osteoblasts.¹⁻³ The great advantage of the use of these adult cells is related to the ease of their procurement, which is not confronted with the same ethical and legal problems involved in the use of embryonic stem cells.¹⁻⁵ However, the collection of material from bone marrow in amounts greater than a few milliliters is very painful and frequently requires general or epidural anesthesia.^{1,6,7}

An alternative source of mesenchymal stem cells was identified in adipose tissue aspirated in plastic surgical operations (liposuction) that allow the extraction of processed lipoaspirate cells with

characteristics similar to those obtained from bone marrow.^{1,6-12} The great advantage of adipose tissue as a source of mesenchymal stem cells is the abundance of material available. In addition, this tissue contains a greater concentration of stem cells than does bone marrow.¹³ These features make adipose tissue a good alternative source for the clinical use of mesenchymal stem cells.^{6,7}

In the case of adipose tissue, there are no data available with regard to differences in concentration of stem cells obtained from different harvest areas of the body. The purpose of this study was to determine whether different liposuctioned adipose tissues in women vary in the concentration of processed lipoaspirate cells.

PATIENTS AND METHODS

A prospective cross-sectional study was conducted in patients undergoing liposuction from April to July of 2007, who were women aged be-

From the Hand Surgery and Microsurgery Service and the Biomedical Research Institute of the Hospital São Lucas, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul. Received for publication August 27, 2007; accepted December 21, 2007.

Copyright ©2008 by the American Society of Plastic Surgeons

DOI: 10.1097/PRS.0b013e31817d5476

Disclosure: No financial support or benefits have been received by the authors of the present study. No commercial association or financial disclosure exists.

tween 21 and 40 years undergoing liposuction of at least four different sites in the same procedure with a minimal volume of 10 ml of fat per segment aspirated, and who agreed to participate in the study. Exclusion criteria were hematologic abnormality, prior chemotherapy, prior radiotherapy, chronic use of corticoids, diabetes mellitus, connective tissue diseases, and abnormality of fat tissue (lipodystrophies).

Procurement of Adult Stem Cells from Adipose Tissue

Under general anesthesia and after usual antiseptic cleaning of the skin with chlorhexidine, liposuction was performed at the body sites defined by presurgical planning. Liposuction was performed using the tumescent technique, which consists of infiltration of the fat layer with a vasoconstrictor-containing local anesthetic solution at the incision sites and in areas to be liposuctioned. This solution consisted of 1000 ml of normal saline containing 10 ml of 7.5% ropivacaine and adrenaline diluted 1:700,000 to cause distention of the skin and lessen bleeding. Liposuction was performed using a vacuum system and cannulas 3, 3.5, and 4 mm in diameter and 15 to 20 cm in length, in the same manner as performed in the aesthetic procedure, where there was no modification in the technique because of the research study. The caliber of the cannula used was defined by the intraoperative surgeon, where there was no one specific caliber for each harvest zone. After liposuction of each region, the lipoaspirate was allowed to set for decantation in separate containers of 100 ml, each one containing material from one of the liposuctioned areas. After 20 minutes, material from each container was collected by filling a 10-ml syringe. The fat from each of the donor sites was sent to the laboratory for separation of the cells. In each patient, cells were not obtained from all the collection sites studied but only from those liposuctioned. This material would be discarded at the end of the procedure. The following harvest sites were differentiated: upper abdomen, lower abdomen, trochanteric region, inner thigh, knee (inner side), and flank (Fig. 1).

Dissociation of Adipose Tissue to Obtain Adult Stem Cells

The fat aspirated was processed for the extraction of adult stem cells. Ten milliliters of adipose tissue from each area was divided into two tubes and washed with 40 ml of Dulbecco's phosphate-buffered saline (Invitrogen Corp., Carlsbad, Calif.)

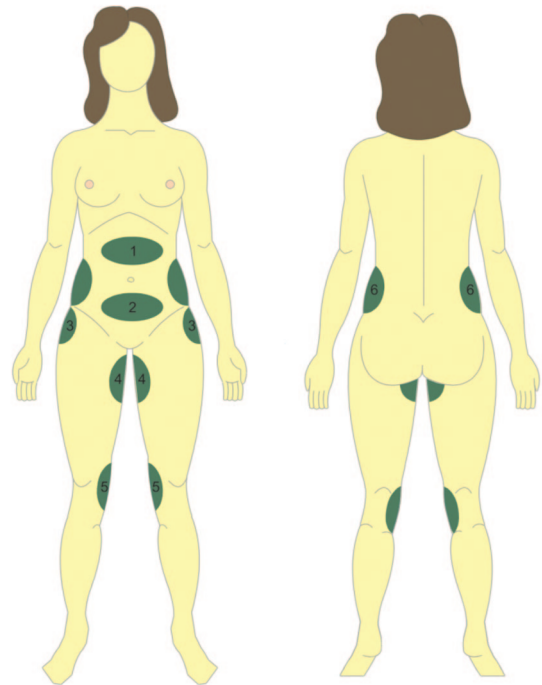


Fig. 1. Areas for collection of adipose tissue. 1, upper abdomen; 2, lower abdomen; 3, trochanteric region; 4, inner thigh; 5, knee; 6, flank.

containing 2% (volume/volume) fetal bovine serum (Invitrogen) to remove erythrocytes. The suspension was centrifuged at 450 *g* for 5 minutes. The adipose tissue was transferred to a new tube to which was added 0.015% (weight/volume) collagenase (Sigma Co., St. Louis, Mo.) diluted in Dulbecco's phosphate-buffered saline in a total of 50 ml. The tube was placed on an orbital shaker and incubated at 37°C for 45 minutes until complete dissociation of the tissue was achieved. Collagenase was inactivated with Dulbecco's Modified Eagle Medium (Invitrogen) containing 10% (volume/volume) fetal bovine serum (Invitrogen) and the cell suspension was divided into two tubes. The cells were centrifuged at 1200 *g* for 10 minutes and the supernatant discarded. The cells were resuspended in 10 ml of Dulbecco's phosphate-buffered saline containing 10% (volume/volume) fetal bovine serum, followed by centrifugation again for washing.

Isolation of Adult Stem Cells

Adult stem cells from dissociated adipose tissue were separated by centrifugation, in a Histopaque-1077 density gradient (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, Mo.). Here, the cells were resuspended in 4 ml of Dulbecco's Modified Eagle Medium, layered on 2 ml of Histopaque, and centri-

fused in a high-speed centrifuge (MSE Mistral 2000; Sanyo, Osaka, Japan) at 400 *g* for 30 minutes. The layer of mononuclear cells obtained from this process, containing stem cells, was removed, washed with 10 ml of Dulbecco's phosphate-buffered saline (Invitrogen), and centrifuged at 1500 rpm for 3 minutes. The cells were resuspended in 500 μ l of Dulbecco's Modified Eagle Medium and quantified. Viability was determined by the trypan blue exclusion assay in a hemocytometer (Optik Labor, Friedrichshofen, Germany), which differentiated living from nonviable cells.

Determination of c-kit-Positive Cell Populations

The cells in the suspension were characterized by flow cytometry with anti c-kit antibodies using a FACScalibur flow cytometer (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, Calif.). A volume of 10 μ l of each antibody was added to 100 μ l of cell suspension and the mixture was incubated at room temperature for 30 minutes in the dark. Afterward, the sample was centrifuged at 200 *g* for 5 minutes and the supernatant discarded. The cells were washed with 2 ml of phosphate-buffered saline (with 0.1% sodium azide and 1% fetal bovine serum) and centrifuged at 200 *g* for 5 minutes. The supernatant was discarded and the cells resuspended in 500 μ l in phosphate-buffered saline. The sample was analyzed within 8 hours.

Statistical Analysis

Descriptive variables were evaluated through means and SD. Mixed models analysis of variance was adopted,¹⁴ with the harvest site effect fixed and the subject level effect as random. When differences were identified using the F test and with an alpha of 0.05, the between-site differences were tested using the Tukey-Kramer test as the post hoc test, also with an alpha of 0.05. Model fit was tested by analysis of residues, and test for normality of the distribution was performed by using the Kolmogorov-Smirnov goodness-of-fit test. Association between age and body mass index with cell count (concentration) was tested using regression analysis, with age and body mass index as covariates (independent or explanatory variables) for each donor site. All analysis were performed using SAS version 9.1 (SAS Institute, Inc. Cary, N.C.).

Ethical Aspects

The study was approved by the Committee on Ethics and Research of Hospital São Lucas, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul.

RESULTS

A total of 25 female patients were evaluated; they had a mean age of 30.7 ± 4.3 years (range, 21 to 37 years) and mean body mass index of 26.2 ± 4.4 (range, 20 to 37 kg/m²). Of these, 23 women were submitted to liposuction at five different locations on the body and two women were submitted to liposuction in four locations. The cells obtained from adipose tissue were positive for CD105, CD117, CD34/CD117 and CD45/CD105. There was no expression of the markers CD34 and CD45. The harvest sites for adipose material were as follows: lower abdomen, upper abdomen, knee (inner side), inner thigh, flank, and trochanteric region. The processed lipoaspirate concentrations obtained for the different body areas are listed in Table 1.

A significant difference ($F = 405.93$; $p < 0.001$) in processed lipoaspirate cell concentration was found among the different harvest sites. The cell concentration in the lower abdomen was significantly ($p < 0.01$) higher than for other locations but did not differ significantly in relation to the crural area ($p = 0.9380$).

When a comparison was made among the different donor sites, the inner thigh and knee showed the second highest stem cell concentrations, with no difference between these two sites ($p = 0.1914$). With respect to fit of the analysis of variance model, using analysis of residuals, there was no indication of heterogeneous variance, and adherence to a straight line was demonstrated indicating normality, which was verified by the Kolmogorov-Smirnov test ($p > 0.150$). There was no evidence that processed lipoaspirate cell concentration was influenced by age ($p = 0.684$) or body mass index ($p = 0.570$).

DISCUSSION

Liposuction use in plastic surgery is a relatively recent method, with only three decades of development.¹⁵ Currently, it is one of the procedures performed most commonly for body shaping

Table 1. Site Lipoaspirated and Processed Lipoaspirate Cell Concentration in 25 Patients*

Region	No. of Patients	Cell Concentration (Mean \pm SD)
Lower abdomen	25	7.92 ± 0.59
Upper abdomen	23	1.49 ± 0.60
Knee	23	7.13 ± 1.17
Inner thigh	19	7.70 ± 0.70
Flank	19	0.73 ± 0.60
Trochanteric region	14	1.74 ± 0.80

* $F = 405.93$; $p < 0.001$. Data expressed in mean \pm SD $\times 10^6$ cells/ml.

and is in high demand by plastic surgeons.¹⁶ Liposuction is carried out in the deep of layer of the adipose panniculus. Lipografting (application of lipoaspirated material) has been carried out in anesthetic and repair procedures,¹⁷ such as complex atrophies and Romberg-type lipodystrophies.¹⁸ For body shaping procedures, increasing amounts of fat are being reinjected, with minimal complications and satisfactory results in the gluteal region.¹⁹

De Ugarte et al.,⁶ in 2003, conducted the first study comparing adult stem cell populations obtained from adipose tissue and bone marrow in the same individual. In the evaluation of five patients, there were no statistically significant differences identified in cell adherence, growth kinetics, cell senescence, capacity for cell differentiation, and efficiency in genetic transduction. Besides having evaluated a small number of patients, there was no concern with regard to sex and age. Still, it should be pointed out that no marker was used in that study that could have quantified accurately and precisely the number of adult stem cells.⁶

Adult stem cells can be characterized by the use of antibodies specific for cell membrane proteins that are characteristic of specific cell populations, by techniques such as flow cytometry. A study published by Zuk et al.³ in 2002 characterized the stem cells isolated from adipose tissue using markers for bone marrow cells. The cells obtained from adipose tissue and those from bone marrow were positive for CD13, CD29, CD44, CD71, CD90, CD105/SH2, SH3, and STRO-1. There was no expression of the markers CD14, CD16, CD31, CD34, CD45, CD56, CD61, CD62E, CD104, and CD106. A difference in expression was observed for CD49d, present only in cells from adipose tissue, and for CD106, seen only in cells from bone marrow.

Factors such as age, gender, body mass index, osteoporosis, and exposure to chemotherapy and radiotherapy can influence the stem cell concentration of material collected from the bone marrow. Strem et al. believe that age, body mass index, and harvest location influence the material obtained by liposuction.¹³ Aust et al.²⁰ examined female patients and described a negative correlation between stem cell concentration obtained in liposuction with body mass index but found no relation with age. In evaluating the osteogenic potential of adipose-derived mesenchymal cells in animals, Shi et al.²¹ did not find a difference in this variable with respect to age. In the present study, age and body mass index did not influence cell concentration obtained. The homogeneity of the

population studied could have contributed to the fact that such differences did not occur.

Peptan et al.²² compared the osteogenic potential of visceral and subcutaneous adipose-derived cells of rabbits. The visceral adipose-derived cells showed the greater osteogenic potential.

With the aim of determining whether the extent of bone production differs if alternative harvest sites are used, Dragoo et al.²³ compared material obtained from abdominal/buttock liposuction of five patients with material obtained from infrapatellar resection of fat pads during total knee arthroplasty in another group of five patients. The density of the tissue-engineered bone was not significantly different between the two groups.

Oedayrajsingh-Varma et al.²⁴ studied the effects of the surgical harvesting procedure and donor site in relation to the yield of stromal vascular fraction cells. Adipose tissue was harvested from the abdominal area ($n = 16$), hip ($n = 11$), and breasts ($n = 4$) using three different surgical techniques: resection, tumescent liposuction, and ultrasound-assisted liposuction. This study did not compare different donor sites from the same patient. They examined the possible difference in relation to the cell yield that could be associated with the method of harvest. The present study included a small number of patients, and different techniques in different patients, and thus the comparison among different adipose tissue donor sites was prejudiced. Besides, adipose tissue harvested from the breast was not considered for analysis in relation to the stromal vascular fraction cells because of the contamination with glandular or connective tissue.

In this study, various samples were obtained from the same patients and compared within the same patient by analysis of variance for mixed models, which considered the effect of harvest site as fixed. In addition, all the procedures were performed using the same technique, and the patients showed a small variation with respect to age and body mass index, which we believe contributed to better achievement of the objective of this study. The caliber of the cannulas, the amount of infiltration solution used in the tumescent technique, and the possible variation in depth of liposuction are factors that can be questioned with respect to possible variation in our results. No routine used for aesthetic liposuction was modified, and we believe that this way is the most adequate for the harvest of material. In view of the experience of plastic surgeons in performing liposuction, we believe that they should be the ones who collect this material for cell therapy, using standard surgical procedures. This study was con-

ducted with only female patients because they represented the population that more often undergoes liposuction in multiple regions in our service. A similar study in men is needed to determine whether there are gender differences with regard to stem cell concentration at different anatomical locations.

CONCLUSIONS

Adipose tissue has been shown to be an excellent source of mesenchymal stem cells. The lower abdomen and the inner thigh may have higher processed lipoaspirate cell concentrations. These sites may turn out to be better sources of adult mesenchymal stem cells.

Jefferson Braga-Silva, M.D., Ph.D.

Av. Ipiranga, 6690
Centro Clínico Pontifical Catholic University
of Rio Grande do Sul, conj. 216
Porto Alegre (RS), CEP-90.610-000, Brazil
jeffmao@terra.com.br

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Dr. João Riboldi for assistance with statistical analysis and Dr. A. Leyva for technical support in the correction of the final version of this article.

REFERENCES

- Zuk, P. A., Zhu, M., Mizuno, H., et al. Multilineage cells from human adipose tissue: Implications for cell-based therapies. *Tissue Eng.* 7: 211, 2001.
- Tuan, R. S., Boland, G., and Tuli, R. Adult mesenchymal stem cells and cell-based tissue engineering. *Arthritis Res. Ther.* 5: 32, 2003.
- Zuk, P. A., Zhu, M., Ashjian, P., et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol. Biol. Cell* 13: 4279, 2002.
- Pittenger, M. F., Mackay, A. M., Beck, S. C., et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284: 143, 1999.
- Tohill, M., and Terenghi, G. Stem-cell plasticity and therapy for injuries of the peripheral nervous system. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 40: 17, 2004.
- De Ugarte, D. A., Morizono, K., Elbarbary, A., et al. Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow. *Cells Tissues Organs* 174: 101, 2003.
- Moseley, T. A., Zhu, M., and Hedrick, M. H. Adipose-derived stem and progenitor cells as fillers in plastic and reconstructive surgery. *Plast. Reconstr. Surg.* 118: 121S, 2006.
- Halvorsen, Y. C., Wilkison, W. O., and Gimble, J. M. Adipose-derived stromal cells: Their utility and potential in bone formation. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 24(Suppl. 4): S41, 2000.
- Patrick, C. W., Jr. Adipose tissue engineering: The future of breast and soft tissue reconstruction following tumor resection. *Semin. Surg. Oncol.* 19: 302, 2000.
- Erickson, G. R., Gimble, J. M., Franklin, D. M., Rice, H. E., Awad, H., and Guilak, F. Chondrogenic potential of adipose tissue-derived stromal cells in vitro and in vivo. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 290: 763, 2002.
- Mizuno, H., Zuk, P. A., Zhu, M., Lorenz, H. P., Benhaim, P., and Hedrick, M. H. Myogenic differentiation by human processed lipoaspirate cells. *Plast. Reconstr. Surg.* 109: 199, 2002.
- Safford, K. M., Hicok, K. C., Safford, S. D., et al. Neurogenic differentiation of murine and human adipose-derived stromal cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 294: 371, 2002.
- Strem, B. M., Hicok, K. C., Zhu, M., et al. Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells. *Keio J. Med.* 54: 132, 2005.
- Brown, H., and Prescott, R. *Applied Mixed Models in Medicine.* New York: Wiley, 2006.
- Illouz, Y. G. Body contouring by lipolysis: A 5-year experience with over 3000 cases. *Plast. Reconstr. Surg.* 72: 591, 1983.
- Rohrich, R. J., Broughton, G., II, Horton, B., Lipschitz, A., Kenkel, J. M., and Brown, S. A. The key to long-term success in liposuction: A guide for plastic surgeons and patients. *Plast. Reconstr. Surg.* 114: 1945, 2004.
- Guerrerosantos, J. Simultaneous rhytidoplasty and lipoinjection: A comprehensive aesthetic surgical strategy. *Plast. Reconstr. Surg.* 102: 191, 1998.
- Vaianti, L., Soresina, M., and Menozzi, A. Parascapular free flap and fat grafts: Combined surgical methods in morphological restoration of hemifacial progressive atrophy. *Plast. Reconstr. Surg.* 116: 699, 2005.
- Cardenas-Camarena, L., Lacouture, A. M., and Tobar-Losada, A. Combined gluteoplasty: Liposuction and lipoinjection. *Plast. Reconstr. Surg.* 104: 1524, 1999.
- Aust, L., Devlin, B., Foster, S. J., et al. Yield of human adipose-derived adult stem cells from liposuction aspirates. *Cytotherapy* 6: 7, 2004.
- Shi, Y. Y., Nacamuli, R. P., Salim, A., and Longaker, M. T. The osteogenic potential of adipose-derived mesenchymal cells is maintained with aging. *Plast. Reconstr. Surg.* 116: 1686, 2005.
- Peptan, I. A., Hong, L., and Mao, J. J. Comparison of osteogenic potentials of visceral and subcutaneous adipose-derived cells of rabbits. *Plast. Reconstr. Surg.* 117: 1462, 2006.
- Dragoo, J. L., Lieberman, J. R., Lee, R. S., et al. Tissue-engineered bone from BMP-2-transduced stem cells derived from human fat. *Plast. Reconstr. Surg.* 115: 1665, 2005.
- Oedayrajasingh-Varma, M. J., van Ham, S. M., Knippenberg, M., et al. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cell yield and growth characteristics are affected by the tissue-harvesting procedure. *Cytotherapy* 8: 166, 2006.