

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

Jeferson Piaia Dalmago

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS-TRONCO
MESENQUIMAIS PROVENIENTES DO TECIDO ADIPOSEO E AVALIAÇÃO DA
SUA VIABILIDADE TECIDUAL APÓS CRIOPRESERVAÇÃO**

Porto Alegre

2019

Jeferson Piaia Dalmago

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS-TRONCO
MESENQUIMAIS PROVENIENTES DO TECIDO ADIPOSEO E AVALIAÇÃO DA
SUA VIABILIDADE TECIDUAL APÓS CRIOPRESERVAÇÃO**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Ilma Simoni Brum

Coorientadora: Dr.^a Gabriela dos Santos Sant'Anna

Porto Alegre

2019

CIP - Catalogação na Publicação

Dalmago, Jeferson Piaia

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS-TRONCO
MESENQUIMAIS PROVENIENTES DO TECIDO ADIPOSE E
AVALIAÇÃO DA SUA VIABILIDADE TECIDUAL APÓS
CRIOPRESERVAÇÃO / Jeferson Piaia Dalmago. -- 2019.
54 f.

Orientadora: Ilma Simoni Brum.

Coorientadora: Gabriela dos Santos Sant'Anna.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) --
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto
de Ciências Básicas da Saúde, Curso de Biomedicina,
Porto Alegre, BR-RS, 2019.

1. Tecido adiposo. 2. Criopreservação. 3.
Lipoenxertia. 4. Células-tronco mesenquimais. I. Brum,
Ilma Simoni, orient. II. Sant'Anna, Gabriela dos
Santos, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Jeferson Piaia Dalmago

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS-TRONCO
MESENQUIMAIS PROVENIENTES DO TECIDO ADIPOSEO E AVALIAÇÃO DA
SUA VIABILIDADE TECIDUAL APÓS CRIOPRESERVAÇÃO**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Aprovado em: 05 de julho de 2019.

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a Ana Helena da Rosa Paz - UFRGS

Prof. Dr. Eduardo Cremonese Filippi-Chiela - UFRGS

Prof.^a Dr.^a Ilma Simoni Brum – UFRGS

AGRADECIMENTOS

Encerrar ciclos nunca é fácil. Ainda mais quando se trata de um tão longo e intenso quanto foi essa graduação. Esse trabalho simboliza o fim de uma jornada que teve início quatro anos atrás e contou com a participação de uma série de pessoas que foram essenciais para que eu chegasse até aqui. Agradecê-las, portanto, é fundamental.

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer a todos os amigos que fiz durante essa graduação, pois somente eles compreendem verdadeiramente a importância de todos os momentos que vivemos juntos. Nos momentos mais difíceis, eles estavam lá, nos mais felizes, eles foram os protagonistas, e no futuro, desejo que eles continuem por perto. Obrigado por me permitirem encontrar em cada um de vocês pedacinhos que faltavam em mim e hoje me fazem ser quem eu sou.

Com igual importância, agradeço à minha família, pois desde a minha infância vocês me deram as ferramentas que tornaram possível que eu trilhasse o meu caminho para chegar até aqui. Em muitos momentos vocês serviram como refúgio sem nem saber e o apoio de vocês durante toda minha vida foi essencial.

Por fim, agradeço à minha orientadora por ter aberto as portas do seu laboratório e a todos os colegas do LABIMET pelo aprendizado e companheirismo, aos órgãos de fomento à pesquisa e à UFRGS, que mudou para sempre (e para melhor!) a minha vida em 2015 e espero que possa continuar mudando a vida de muitas outras pessoas por muitos outros anos.

RESUMO

A transferência de gordura autóloga como preenchimento para a reconstrução de tecidos e órgãos é possível por meio de técnicas cirúrgicas de lipoenxertia, que se consolidaram como grandes aliadas na reconstrução das mamas após procedimentos invasivos. Esses procedimentos seguem um protocolo específico de lipoaspiração, processamento e injeção do tecido na região receptora a partir de locais naturalmente predispostos ao acúmulo do tecido adiposo, como o abdômen e a parte traseira das coxas. As adversidades enfrentadas por essa técnica se encontram na variável taxa de absorção do tecido adiposo na região doadora, que em muitos casos torna necessária a realização de novos procedimentos para o alcance de melhores resultados, e a ausência de um protocolo adequado de criopreservação desse tecido, que obriga a submissão da paciente a novas lipoaspirações para a coleta do material a ser enxertado em cada nova cirurgia de correção. Desenvolver um método adequado de criopreservação desse tecido é uma necessidade para o alcance de melhores resultados estéticos e funcionais e para a redução dos transtornos causados à paciente, portanto avaliamos a sua viabilidade após um período de criopreservação de 6 meses utilizando a trealose, um agente crioprotetor não-tóxico, seguindo um protocolo específico de lipoaspiração e processamento do tecido. Além disso, também padronizamos um protocolo de isolamento e expansão das células-tronco mesenquimais presentes no tecido adiposo para futura avaliação da sua viabilidade após criopreservação com o mesmo agente crioprotetor.

Palavras-chave: Tecido adiposo. Criopreservação. Lipoenxertia. Células-tronco mesenquimais. Trealose.

ABSTRACT

The autologous fat transfer as a filling for the reconstruction of tissues and organs is possible by means of surgical techniques of lipofilling, which are consolidated allies in the breast reconstruction surgeries after invasive procedures. These procedures follow a specific protocol for liposuction, processing and injection of tissue into the recipient region from sites naturally predisposed to the accumulation of adipose tissue, such as the abdomen and the back of the thighs. The adversities faced by this technique are found in the variable rate of absorption of adipose tissue in the donor region, which in many cases makes it necessary to perform new procedures to achieve better results, and the absence of an adequate protocol for cryopreservation of this tissue, which requires the submission of the patient to new liposuction procedures to collect the material to be injected at each new correction surgery. Develop an adequate method for cryopreservation of this tissue is necessary to reach better aesthetic and functional results and to reduce the disorders caused to the patient, therefore we evaluated its viability after a period of cryopreservation of 6 months using trehalose, a non-toxic cryoprotective agent, following a specific protocol of liposuction and tissue processing. Furthermore, we also standardized a protocol for the isolation and expansion of the mesenchymal stem cells present in the adipose tissue for future evaluation of its viability after cryopreservation with the same cryoprotectant.

Keywords: Adipose tissue. Cryopreservation. Lipofilling. Mesenchymal stem cells. Trehalose.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Classificação histológica dos subtipos de câncer de mama.....	07
Figura 2 – Representação do protocolo de coleta e processamento do tecido adiposo....	09
Figura 3 – Potencial de diferenciação das células-tronco mesenquimais.....	15

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

CTM	células-tronco mesenquimais
DMSO	dimetilsulfóxido
GPDH	glicerol 3-fosfato desidrogenase
DHAP	fosfato de diidroxiacetona
NADH	dinucleotídeo de nicotinamida e adenina
G3P	glicerol 3-fosfato
HCPA	hospital de clínicas de porto alegre
TCLE	termo de consentimento livre e esclarecido
PBS	tampão fosfato-salina
DMEM	meio de Dulbecco modificado por Eagle
SFB	soro fetal bovino
PFA	paraformaldeído

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO COMPREENSIVA	7
1.1 CÂNCER DE MAMA	7
1.1.1 Cirurgia Oncoplástica	8
1.1.2 Lipoenxertia	8
1.2 TECIDO ADIPOSEO	10
1.2.1 Criopreservação	12
1.2.1.1 Agentes Crioprotetores.....	12
1.2.1.2 GPDH (Glicerol-3-Fosfato Desidrogenase).....	14
1.2.2 Células-tronco Mesenquimais.....	14
2 JUSTIFICATIVA	16
3 OBJETIVOS	17
3.1 OBJETIVO GERAL	17
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
4 ARTIGO CIENTÍFICO.....	18
5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	34
REFERÊNCIAS	35
APÊNDICE A – INSTRUMENTO DE COLETA DE DADOS	40
ANEXO A – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA X.....	43

1 INTRODUÇÃO COMPREENSIVA

1.1 CÂNCER DE MAMA

Consoante ao aumento da expectativa de vida, fatores como a adoção de práticas pouco saudáveis e o aumento da exposição aos fatores de risco vêm contribuindo para o crescimento da incidência de todos os tipos de câncer na população. Só no ano de 2018, foram estimados mais de 18 milhões de novos casos de câncer no mundo, sendo 8,6 milhões deles desenvolvidos em mulheres. Desta parcela, cerca de 25,4% dos casos se devem ao câncer de mama, o tipo de câncer que mais comumente acomete mulheres (BRAY et al., 2018). De forma geral, ele pode ser classificado em carcinoma *in situ*, quando ainda encontra-se confinado no tecido de origem, ou carcinoma invasivo, quando infiltrou a membrana basal e possui a capacidade de gerar metástases, com suas respectivas subclassificações (Figura 1) (LI, 2010; MALHOTRA et al., 2010).

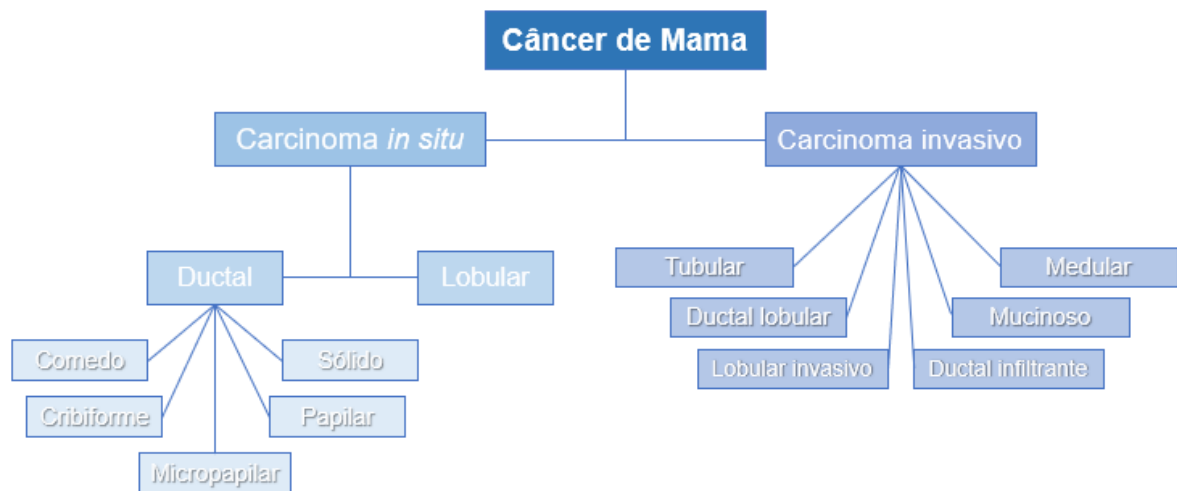


Figura 1. Classificação histológica dos subtipos de câncer de mama. Adaptado de (MALHOTRA et al., 2010).

Apesar de ainda ser responsável pela segunda maior taxa de incidência de câncer no mundo, o câncer de mama vem apresentando nas últimas décadas uma diminuição no seu índice de mortalidade em regiões mais desenvolvidas (BRAY et al., 2018; FERLAY et al., 2015; MERINO BONILLA; TORRES TABANERA; ROS MENDOZA, 2017). A *American Cancer Society* estima que entre os anos de 1989 e 2016 a mortalidade em decorrência do câncer de mama tenha caído 40% na população feminina dos Estados Unidos e a sobrevida de 5 anos

tenha alcançado os 90% (SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2019). Essa queda se deve principalmente ao avanço nos tratamentos disponíveis e aos esforços direcionados à detecção precoce, que vai desde a educação da população e de profissionais da saúde para o reconhecimento dos principais sinais e sintomas da doença à aplicação de exames de rastreamento na população saudável a fim de identificar lesões sugestivas de câncer em seu estágio inicial.

Como consequência desses avanços, há um aumento do número de sobreviventes do câncer de mama e uma demanda por procedimentos e técnicas cirúrgicas mais refinadas, que tragam melhores resultados funcionais e estéticos. Nesse campo, como alternativa às técnicas mais radicais, como a mastectomia total, surge a cirurgia oncoplástica, que associa os procedimentos de ressecção do tumor da cirurgia oncológica às técnicas de cirurgia plástica e reconstrutiva (CLOUGH et al., 2010).

1.1.1 Cirurgia Oncoplástica

O termo cirurgia oncoplástica de mama tem origem nos anos 1980 e à época foi utilizado para representar a união de técnicas quimio e radioterápicas a métodos cirúrgicos mais conservativos da mama, objetivando melhores resultados estéticos e menor morbidade à paciente em comparação às técnicas mais tradicionais. Atualmente, representa qualquer técnica associada à cirurgia oncológica que promova a preservação do formato dos seios e ofereça uma maior qualidade de vida após a cirurgia (MACMILLAN; MCCULLEY, 2016).

Há uma série de vantagens na utilização de técnicas oncoplásticas para o tratamento cirúrgico do câncer de mama, como a possibilidade de remodelamento imediato da mama após extensas ressecções e do tratamento de tumores maiores, evitando a realização de mastectomias (CLOUGH et al., 2018). Dentre as muitas técnicas já descritas com esta finalidade, pode-se destacar o papel da lipoenxertia (ou transplante de gordura autólogo, do inglês *lipofilling*) na correção de perdas de volume, forma, projeção e sensibilidade da mama, uma vez que apresenta baixas taxas de complicação, resultados muito bons e excelente aceitação por parte das pacientes (DELAY et al., 2009).

1.1.2 Lipoenxertia

A utilização de gordura como instrumento terapêutico na reconstrução de tecidos moles não é uma inovação. Desde 1893 estudos avaliam a possibilidade do transplante de gordura

(NEUBER, 1893), mas foi apenas após a publicação de Illouz *et al.* em 1988 que a prática se difundiu e recebeu reconhecimento mundialmente (DELAY *et al.*, 2009; ILLOUZ, 1988). Muitas preocupações quanto a confiabilidade e a segurança desta técnica surgiram após este período, sendo o interesse por ela apenas retomado depois da publicação dos estudos conduzidos por Coleman na década de 90, que detalharam, a partir de um protocolo específico de lipoaspiração, preparo e injeção do enxerto, a confirmação da possibilidade de realização da transferência do enxerto autólogo de gordura (COLEMAN, 1995, 1997). Desde então, uma série de outros estudos buscaram avaliar a eficácia e a tolerância do método, assim como comprovar sua segurança clínica e radiológica, aumentando ainda mais o interesse pela técnica (CHIRAPPAPHA *et al.*, 2015; COSTANTINI *et al.*, 2013; DELAY *et al.*, 2009; GUTOWSKI *et al.*, 2009; KASEM *et al.*, 2015).

O protocolo idealizado por Coleman consiste em três etapas, sendo a primeira delas a coleta de tecido adiposo de sítios anatomicamente favorecidos pela deposição de gordura, como o abdômen e as coxas, por meio de uma cânula de lipoaspiração com sucção a níveis moderados de pressão, a fim de minimizar o dano causado aos adipócitos. Esse material é então centrifugado a 3.000 rpm durante 3 minutos com a finalidade de separar o tecido obtido em três fases: uma camada superior, composta majoritariamente pelo óleo dos adipócitos rompidos; uma camada intermediária, composta pelo tecido adiposo íntegro; e uma camada inferior, composta pela fração hemática tecidual, que é rica em células progenitoras (Figura 2).

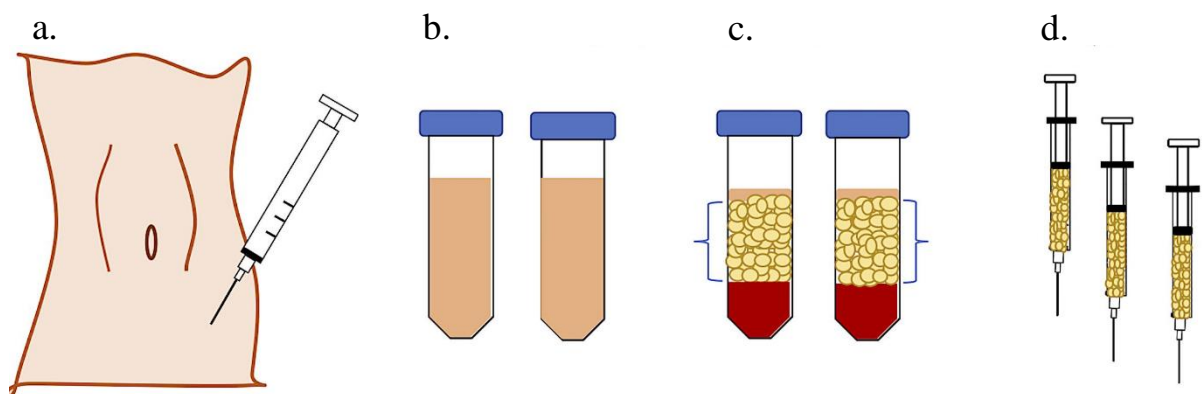


Figura 2. Representação do protocolo idealizado por Coleman para a coleta e processamento do tecido adiposo. (a) Processo de coleta do tecido adiposo do abdômen por meio de uma cânula ligada a uma seringa; (b) Tecido transferido a um tubo Falcon apropriado para centrifugação; (c) Separação do tecido em 3 fases após a centrifugação, destacando a porção com adipócitos viáveis; (d) Seringas com o tecido adiposo viável pronto para ser enxertado. Modificado de (MAHONEY *et al.*, 2018).

Na etapa final, a área receptora pode ser dessensibilizada por anestesia local e a camada intermediária do tecido centrifugado é então injetada, em diferentes direções, por meio de cânulas ligadas a seringas contendo os adipócito íntegros, formando microtúneis de gordura rodeados por tecido vascularizado, favorecendo a sobrevivência do tecido e evitando a formação de áreas necróticas ou de cistos (COLEMAN, 1997). Resultados superiores às demais técnicas utilizadas são obtidos pela realização da técnica de Coleman, pois ela permite a restauração do contorno e do volume das mamas de forma mais natural e eficaz (DELAY et al., 2009). Outros estudos também mostram que as atividades endócrina, autócrina e parácrina do tecido adiposo transplantado promovem a revascularização dos tecidos adjacentes por mecanismos de liberação de fatores de crescimento angiogênicos e antiapoptóticos (CAO et al., 2005) das células progenitoras presentes, diminuindo assim a ocorrência de atrofia do tecido e promovendo a melhor aceitação do enxerto.

1.2 TECIDO ADIPOSEO

Todas as espécies animais desenvolveram algum método de estocar energia no seu corpo para que possa ser utilizada conforme a necessidade futura do organismo. Essa energia é proveniente dos nutrientes presentes nos alimentos ingeridos, que são degradados em moléculas menores que podem entrar na corrente sanguínea e serem absorvidas pelas células. Diversos órgãos e tecidos capturam essas moléculas e, por processos bioquímicos, as modificam e as utilizam para manter todas as atividades fisiológicas normais e o correto funcionamento do organismo, seja por meio da respiração, da digestão, das atividades cerebrais ou da regeneração de células. No entanto, quando a ingestão calórica é excessiva ou a demanda energética do organismo é diminuída, o excesso de energia é depositado no tecido adiposo na forma de triglicerídeos (ESTEVE RÀFOLS, 2014).

Nos mamíferos, o tecido adiposo é abundante e pode ser classificado em dois tipos, que diferem principalmente quanto à sua função: o tecido adiposo branco e o tecido adiposo marrom. Enquanto o primeiro é a principal forma de estoque de energia no organismo desses animais, o segundo atua como termorregulador, sendo principalmente importante em recém-nascidos e em animais que hibernam, pois também acumula lipídeos em seu interior e pode gerar aquecimento para o corpo ao metabolizar os ácidos graxos presentes no tecido devido à alta concentração de mitocôndrias em seu citoplasma (CANNON; NEDERGAARD, 2004). O tecido adiposo branco, por sua vez, encontra-se distribuído por todo o corpo, mas tende a acumular-se em regiões como o omento, o mesentério e o retroperitônio, sendo especialmente

localizado a nível subcutâneo nas nádegas, nas coxas e no abdômen (ESTEVE RÀFOLS, 2014). Nesse tecido também podem-se destacar as funções isolante e de proteção mecânica a órgãos vitais, assim como a capacidade dos adipócitos maduros, as células características desse tecido, de capturar a glicose, sintetizar triglicerídeos e realizar processos como a lipogênese e a lipólise (LARGE et al., 2004).

Além dos adipócitos maduros, o tecido adiposo também é constituído por pré-adipócitos, fibroblastos, células do músculo liso vascular, células endoteliais, monócitos e macrófagos residentes, linfócitos e pela fração estromal vascular, onde se encontram as células-tronco mesenquimais (CTM), que possuem alto potencial de diferenciação em outros tipos celulares da mesma linhagem (SCHÄFFLER; BÜCHLER, 2007). Todos esses diferentes tipos celulares contribuem para a alta complexidade desse tecido que por muito tempo foi considerado pouco ativo metabolicamente e de pouca importância, mas hoje é considerado um dos maiores órgãos endócrinos do nosso organismo (KERSHAW; FLIER, 2004). Nas últimas décadas, o interesse pelo estudo do tecido adiposo vem aumentando, pois muitos estudos identificaram e destacam a importância de uma série de substâncias que são secretadas por ele, como as adipocinas, os prostanoídes e os hormônios esteróides, que por atividades parácrina e autócrina atuam regulando muitos processos fisiológicos e metabólicos (ESTEVE RÀFOLS, 2014; MASUZAKI et al., 2001; TRAYHURN, 2005)

Todas essas características são pontos positivos para a utilização do tecido adiposo como enxerto autólogo em procedimentos de reconstrução mamária pela técnica de lipoenxertia. No entanto, a dificuldade enfrentada atualmente na sua realização encontra-se no fato de que existe um limite físico de aceitação do enxerto na área receptora e há uma taxa variável da sua absorção, que pode variar entre 30% a 50% do volume de gordura injetada, tornando necessário, portanto, a realização de novos procedimentos cirúrgicos a fim de atingir o resultado esperado (DELAY et al., 2009; HIVERNAUD et al., 2015; KAUFMAN et al., 2007; PU et al., 2008; RIETJENS et al., 2011). Somado a isso, encontra-se o fato de que atualmente também não existe um consenso sobre os métodos adequados para o armazenamento e a preservação do tecido adiposo a longo prazo, o que acarreta necessidade de submissão da paciente a novos procedimentos lipoaspirativos a cada vez que deseja-se enxertar mais gordura para compensar o volume perdido pela variável taxa de absorção do tecido, ocasionando também em descartes recorrentes do material lipoaspirado excedente (CUI et al., 2007; PU et al., 2004, 2006).

A chave para solucionar este problema encontra-se na elaboração de protocolos de criopreservação específicos para esse material, que aliem as técnicas corretas de congelamento

e descongelamento e utilizem agentes crioprotetores adequados, a fim de manter as funções fisiológicas e metabólicas ótimas do tecido. Tal padronização permitiria a preservação do tecido adiposo a longo prazo, possibilitando a realização de procedimentos futuros de lipoenxertia sem a necessidade de novas lipoaspirações e garantindo assim menor morbidade às pacientes e melhor recuperação, assim como poderia ser extrapolada para as demais áreas afins da medicina regenerativa, trazendo grandes benefícios para a população em geral.

1.2.1 Criopreservação

A criopreservação é um método de armazenamento de materiais biológicos em temperaturas muito baixas que se baseia na redução do metabolismo celular das amostras a fim de manter sua viabilidade por longa duração. Durante o período de armazenamento, que ocorre em nitrogênio líquido (a aproximadamente $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$), os componentes celulares se tornam estáveis e a atividade das organelas e células constituintes se encontra tão diminuída que reações biológicas e químicas não são capazes de causar danos e comprometer sua integridade. No entanto, durante as etapas de congelamento e descongelamento danos podem ser causados às membranas celulares devido à formação de cristais de gelo intra e extracelulares, que podem afetar o seu funcionamento e até mesmo culminar no desencadeamento de processos apoptóticos (JANG et al., 2017).

A fim de evitar esses danos, anteriormente à criopreservação em nitrogênio líquido, alguns cuidados podem ser tomados para garantir a viabilidade do material em estudo, como a adição de agentes crioprotetores. Tal procedimento é um passo fundamental para o sucesso da técnica, pois quando possui as características corretas e é utilizado na concentração adequada, o agente crioprotetor reduz o dano causado aos tecidos pelas baixas temperaturas e contribui positivamente na manutenção das suas características originais (CASTRO et al., 2011; PEGG, 2002).

1.2.1.1 Agentes Crioprotetores

Os agentes crioprotetores são substâncias de classes variadas que realizam sua função protetiva por meio de diferentes mecanismos. Conhecer a sua natureza e suas características é essencial para determinar a melhor combinação com o material que se deseja criopreservar e com a finalidade do seu uso futuro, visto que à temperatura ambiente algumas dessas substâncias podem apresentar potencial tóxico aos materiais biológicos. O dimetilsulfóxido

(DMSO) é um dos exemplos desses compostos. Amplamente utilizado na solubilização de pequenas moléculas orgânicas, ele interage com as membranas e as atravessa rapidamente por meio de difusão, substituindo parcialmente a água no interior da célula e se ligando aos átomos de hidrogênio para aumentar a viscosidade da solução, diminuir seu ponto de congelamento e evitar a formação de cristais de gelo intracelulares (JAIN; PAULSON, 2006). Seu uso é muito difundido na criopreservação de gametas e embriões, mas os metabólitos gerados pela sua degradação à temperatura ambiente são tóxicos e demandam a sua remoção completa do material após o descongelamento para que ocorra a administração do material criopreservado *in vivo* (CASTRO et al., 2011; CUI et al., 2007; CUI; PU, 2009; PU et al., 2004, 2006).

Diferentemente do DMSO, alguns agentes crioprotetores atuam de forma extracelular e ocorrem naturalmente em organismos vivos, não possuindo potencial tóxico. Tais compostos apresentam características muito mais adequadas para a prática clínica, uma vez que a ausência de toxicidade eliminaria a necessidade de retirada do crioprotetor antes da administração *in vivo*, reduzindo os custos e o tempo do processo e aumentando a integridade e a qualidade das células do enxerto. Nesse cenário, podemos destacar a trealose, um dissacarídeo não-redutor que estabiliza e protege as membranas celulares e as proteínas dos materiais biológicos durante a criopreservação (ERDAG et al., 2002). Encontrado em uma variedade de leveduras e organismos que conseguem sobreviver ao congelamento e desidratação, a trealose não apresenta efeitos tóxicos teciduais e exerce seu efeito crioprotetivo nas células animais de forma não-penetrante, por se concentrar em regiões extracelulares e remover água do interior das células, diminuindo a formação de cristais de gelo (ZHANG et al., 2016).

A combinação entre um agente crioprotetor penetrante, como o DMSO, e um agente não-penetrante, como a trealose, é reportada em diversos estudos como uma combinação muito eficiente na criopreservação de diversos materiais biológicos (CUI; PU, 2009; ERDAG et al., 2002; PU et al., 2004, 2006). No entanto, mesmo em baixas concentrações, o DMSO ainda deve ser retirado por meio de repetidas centrifugações do material que se deseja aplicar *in vivo*, afetando a qualidade das células e tecidos que foram criopreservadas. Diversos parâmetros podem ser utilizados para avaliar a viabilidade do tecido adiposo após a criopreservação. Dentre eles, destaca-se o método de avaliação da atividade enzimática de GPDH (Glicerol-3-Fosfato Desidrogenase).

1.2.1.2 GPDH (*Glicerol-3-Fosfato Desidrogenase*)

A avaliação da atividade enzimática de GPDH é um parâmetro adequado para se usar como comparativo da viabilidade do tecido adiposo antes e após a sua criopreservação, pois essa enzima é um importante componente do metabolismo de lipídeos e de carboidratos. Ela é responsável por catalisar a conversão reversível do fosfato de diidroxiacetona (DHAP) e da nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH) em sua forma oxidada (NAD⁺) e glicerol 3-fosfato (G3P) e a quantificação da sua atividade é uma técnica relativamente simples e apropriada a diversos tipos celulares e tecidos (CUI; PU, 2009; PU et al., 2005a, 2008). Sua concentração nas amostras é determinada por meio de um ensaio colorimétrico com resultados diretamente proporcionais à preservação da atividade metabólica normal do tecido (PU et al., 2005b, 2010).

1.2.2 Células-tronco Mesenquimais

Além da correta criopreservação do tecido, outras medidas também podem ser avaliadas para a obtenção de melhores resultados nas cirurgias reconstrutivas, como a exploração das propriedades das CTM derivadas do tecido adiposo. Por definição, células-tronco são tipos celulares indiferenciados com capacidade de autorrenovação que, quando em condições apropriadas, podem se diferenciar em células especializadas (NOWAK et al., 2015; WEISSMAN, 2000). Devido a essas características, atualmente são muito utilizadas em pesquisas e em terapias para o tratamento de diversas patologias. Essas células podem ser classificadas em: embrionárias ou pluripotentes, quando são encontradas na massa celular interna do embrião no estágio de blastocisto e podem dar origem a todos os tipos celulares; adultas, quando podem se diferenciar em todas as células de determinada linhagem; e pluripotentes induzidas, quando adquirem a pluripotência por meio de reprogramação laboratorial (ULLAH; SUBBARAO; RHO, 2015).

Na vida pós-natal, as células-tronco adultas presentes no organismo são chamadas de unipotentes ou multipotentes, pois possuem menor capacidade de diferenciação que as células-tronco embrionárias, e são encontradas em grande quantidade na medula óssea, dando origem aos tecidos e células de linhagem hematopoiética e mesenquimal. Atualmente, sabe-se que outros tecidos também podem ser fontes ricas e viáveis para a extração de células-tronco mesenquimais, como a polpa dentária, o cordão umbilical, o fluido amniótico e o tecido adiposo (ULLAH; SUBBARAO; RHO, 2015; WAGNER et al., 2005). No tecido adiposo, é a partir da

fração estromal vascular que as células-tronco multipotentes podem ser isoladas do tecido e expandidas em cultura celular, mantendo seu alto potencial de diferenciação em adipócitos maduros e outros tecidos de linhagem mesodérmica, como condrócitos, osteócitos e fibras musculares esquelética e cardíaca (Figura 3) (MINTEER; MARRA; RUBIN, 2012; STREM et al., 2005).

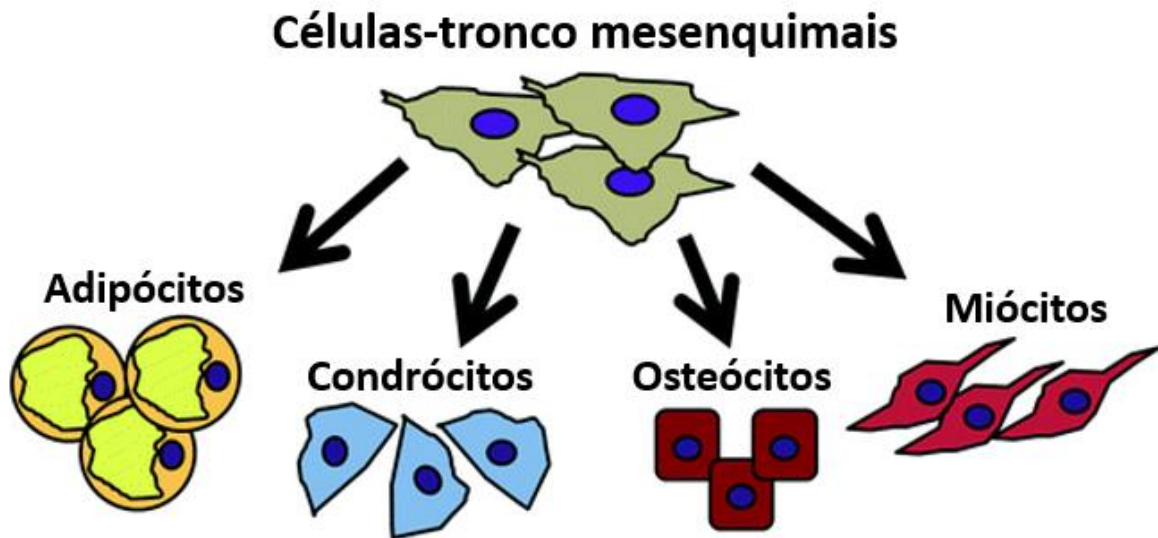


Figura 3. Potencial de diferenciação das células-tronco mesenquimais em uma variedade de células, como adipócitos, condrócitos, osteócitos e miócitos. Modificado de (MINTEER; MARRA; RUBIN, 2012).

O conjunto dessas características confere às células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo grande importância nas pesquisas e em procedimentos do campo da medicina regenerativa e da reconstrução de tecidos e órgãos, uma vez que elas apresentam grandes vantagens em comparação às células-tronco provenientes da medula óssea. O tecido adiposo possui maior quantidade de células-tronco mesenquimais por mililitro (FRASER et al., 2006) e a taxa de sucesso para o seu isolamento é cerca de 40 vezes maior que o das células da medula óssea (KERN et al., 2006). Além disso, essas células podem ser obtidas em maiores quantidades e utilizando técnicas mais baratas e com abordagens menos invasivas, tornando possíveis procedimentos que oferecem menor morbidade aos pacientes e melhores taxas de recuperação (ZHU et al., 2008).

2 JUSTIFICATIVA

O uso do enxerto de gordura autólogo para a reconstrução de órgãos e tecidos moles é uma opção viável que traz resultados superiores às demais técnicas utilizadas atualmente. No entanto, devido à variabilidade da taxa de absorção do tecido na região receptora, novas cirurgias podem ser necessárias para a correção de defeitos menores. Uma vez que não existe consenso sobre a metodologia adequada para o armazenamento a longo prazo do tecido adiposo, novas lipoaspirações sob o efeito de anestesia geral são necessárias para a coleta do material a ser enxertado.

Este estudo visa, portanto, avaliar a possibilidade da criopreservação do tecido adiposo utilizando agentes crioprotetores que não sejam tóxicos às células vivas, assim como padronizar um protocolo de expansão e isolamento de células-tronco para futura avaliação de sua viabilidade após criopreservação com o mesmo agente crioprotetor.

3 OBJETIVOS

Verificar se o tecido adiposo se mantém viável após a criopreservação com um agente crioprotetor não-tóxico e padronizar um protocolo de isolamento e expansão das células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo.

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar, por meio do ensaio colorimétrico da atividade enzimática de GPDH, a viabilidade do tecido adiposo fresco e após a criopreservação por 6 meses com dois diferentes agentes crioprotetores e isolar, expandir e diferenciar células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo *in vitro*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar a atividade metabólica dos adipócitos no tecido adiposo fresco e após a criopreservação por 6 meses com os tratamentos de DMSO 0,5 M e trealose 0,2 M ou apenas trealose 0,35 M por meio da quantificação da atividade de GPDH;
2. Padronizar o isolamento e expansão *in vitro* das células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo em amostras de tecido fresco;
3. Avaliar *in vitro* a multipotencialidade das células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo por meio da diferenciação em adipócitos, osteócitos e condrócitos.

4 ARTIGO CIENTÍFICO

ANNALS OF PLASTIC SURGERY

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS PROVENIENTES DO TECIDO ADIPOSEO E AVALIAÇÃO DA SUA VIABILIDADE TECIDUAL APÓS CRIOPRESERVAÇÃO

*Jeferson P. Dalmago, BS, Márcia P. de Melo, MD, PhD, Gabriela dos S. Sant'Anna, PhD e
Ilma S. Brum, PhD*

Resumo: Este estudo avalia a viabilidade do tecido adiposo após a criopreservação durante 6 meses com dois diferentes agentes crioprotetores e padroniza um protocolo de isolamento e expansão das células-tronco mesenquimais (CTM) derivadas do tecido adiposo. As amostras foram obtidas por meio da lipoaspiração da gordura subcutânea abdominal segundo o método de Coleman de pacientes com indicação de reconstrução mamária com emprego de lipoenxertia, centrifugadas a 3.000 rpm para a separação do tecido em 3 camadas e obtenção da porção intermediária (adipócitos viáveis) e inferior (fração estromal vascular) e divididas em três grupos: tecido fresco ($n = 2$), tecido criopreservado por 6 meses com DMSO 0,5 M + trealose 0,2 M ($n = 5$) e tecido criopreservado por 6 meses com apenas trealose 0,35 M ($n = 6$). A viabilidade dos adipócitos do tecido foi testada por meio de um ensaio colorimétrico da atividade enzimática de glicerol 3-fosfato desidrogenase (GPDH), uma importante enzima para o metabolismo de lipídeos e carboidratos, e as CTM caracterizadas pela indução da sua diferenciação. Quando comparados, os três grupos não apresentaram diferença estatística quanto à atividade da enzima ($0,049 \pm 0,0007$ mU/mL, $0,044 \pm 0,0019$ mU/mL e $0,047 \pm 0,0048$ mU/mL, respectivamente, $P 0,257$) e as CTM foram confirmadas pela morfologia fibroblastóide e multipotencialidade após indução da diferenciação em adipócitos, osteócitos e condrócitos. Esses resultados indicam que o tecido adiposo pode ser criopreservado adequadamente na presença de agentes crioprotetores não-tóxicos, como a trealose, representando um grande avanço para as técnicas de reconstrução de tecidos e órgãos, e as CTM podem ser isoladas e expandidas adequadamente, permitindo a futura avaliação da sua

viabilidade após a criopreservação com o mesmo agente crioprotetor e o seu emprego na técnica de lipoenxertia.

Palavras-chave: tecido adiposo, criopreservação, GPDH, células-tronco mesenquimais, trealose, lipoenxertia

INTRODUÇÃO

O uso do tecido adiposo como instrumento terapêutico na reconstrução de tecidos e órgãos é avaliado desde o final do século XIX e uma prática recorrente desde a publicação dos estudos realizados por Illouz *et al* no século seguinte.^{1,2} Por meio de um protocolo específico de lipoaspiração e processamento, esse tecido pode ser usado como enxerto autólogo na reconstrução mamária pela técnica da lipoenxertia, que apresenta resultados muito positivos na correção de perdas de forma e volume do órgão e grande aceitação por parte das pacientes.³ A grande limitação encontrada por esse procedimento encontra-se na variável taxa de absorção do tecido após a cirurgia, que pode alcançar até 50% do volume enxertado, tornando necessários novos procedimentos cirúrgicos para o alcance do resultado idealizado.³⁻⁷ A ausência de um método adequado de criopreservação do tecido adiposo obriga a realização de novas lipoaspirações a cada cirurgia para correção do volume, submetendo a paciente novamente à anestesia geral e a uma série de outras adversidades, como danos à região doadora do tecido devido aos recorrentes procedimentos, aumento dos custos e da morbidade da técnica.⁸⁻¹⁰

Com o desenvolvimento de técnicas apropriadas de armazenamento a longo prazo, no entanto, o tecido adiposo poderia ser conservado em bancos após uma única lipoaspiração para o uso futuro da paciente, evitando o descarte do material excedente quando o limite do volume a ser enxertado é atingido e todas as demais desvantagens apresentadas pela técnica.⁸ A criopreservação envolve etapas de congelamento e descongelamento do material biológico as quais podem causar danos às membranas celulares pela formação de cristais de gelo, por isso diversos estudos avaliam o potencial dos agentes crioprotetores na proteção desse tecido.^{11,12} Objetivando a aplicação *in vivo* do material criopreservado, é importante que o agente crioprotetor não apresente potencial tóxico às células vivas. Desse modo, a trealose, um dissacarídeo presente naturalmente em uma variedade de organismos que sobrevivem à desidratação, exerce um importante papel removendo a água do interior das células antes da criopreservação para diminuir a formação dos cristais de gelo e poderia apresentar as

características necessárias para proteger o tecido adiposo durante esse período de armazenamento.¹³

Outras características do tecido adiposo também podem ser exploradas para contribuir com o alcance de melhores resultados nas técnicas cirúrgicas de reconstrução de órgãos. Dentre elas, podemos citar a grande quantidade de células-tronco mesenquimais (CTM) presentes nesse tecido, a sua habilidade de diferenciação em outras células da linhagem mesenquimal quando em condições apropriadas e a capacidade de secreção de substâncias que promovam a melhor aceitação do enxerto.¹⁴⁻¹⁷ Apesar de alguns estudos já terem reportado a possibilidade da criopreservação do tecido adiposo em condições específicas, este estudo busca avaliar a viabilidade do tecido por meio de um ensaio colorimétrico da atividade enzimática de glicerol 3-fosfato desidrogenase (GPDH), uma importante enzima do metabolismo de lipídeos, após um protocolo específico de lipoaspiração (segundo a técnica de Coleman) e criopreservação com trealose, um agente crioprotetor não-tóxico, que possa ser reproduzido no ambiente hospitalar, assim como padronizar o isolamento e expansão *in vitro* das CTM derivadas desse tecido.^{9,10,18,19}

MATERIAIS E MÉTODOS

Coleta do tecido adiposo

As amostras de tecido adiposo provenientes de lipoaspiração da gordura subcutânea abdominal foram obtidas de 12 pacientes do sexo feminino atendidas pelo Serviço de Mastologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) apresentando indicação de reconstrução mamária com emprego de lipoenxertia. Todas as pacientes foram previamente informadas e assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) autorizando a coleta, que ocorreu segundo o protocolo desenvolvido por Coleman^{19,20}. O tecido adiposo da região abdominal inferior foi coletado utilizando uma seringa de 60 cc conectada a uma cânula de lipoaspiração de 3,0 mm de diâmetro e 15 cm de comprimento e então transferido para seringas de 10 mL, onde foi centrifugado a 3.000 rpm por 3 minutos a fim de promover a separação em três fases: oleosa (superior), gordurosa (central) e hemática (inferior). Cerca de 30 mL da porção gordurosa central de cada paciente foi reservada para o estudo e dividida entre os grupos de acordo com o protocolo experimental para a criopreservação.

Protocolo experimental

A porção de adipócitos viáveis obtida após a centrifugação do lipoaspirado foi dividida em três grupos: controle (tecido adiposo fresco, não-criopreservado, colocado em formalina 10% imediatamente após a coleta), DMSO + trealose (tecido adiposo criopreservado em solução contendo DMSO 0,5 M e trealose 0,2 M) e trealose (tecido adiposo criopreservado na presença de solução contendo trealose 0,35 M). Os agentes crioprotetores foram preparados em soluções de 10 mL de tampão fosfato-salina (PBS) e a proporção utilizada foi a de 1:1 para a quantidade de tecido adiposo criopreservado.

Agentes crioprotetores

Nesse estudo, o dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma, St. Louis, MO), um agente crioprotetor permeável que reduz a formação de gelo intracelular e estabiliza membranas, e a trealose (Merck S/A, Brasil), um agente crioprotetor não-permeável que contribui para a estabilização de proteínas e membranas, foram utilizados nas concentrações de 0,5 M e 0,2 e 0,35 M, respectivamente, de acordo com estudos prévios^{8-10,18,21}.

Protocolo de criopreservação e descongelamento

Depois da coleta e centrifugação, os tecidos foram divididos em alíquotas para a solubilização com os agentes crioprotetores em criotubos. Após a mistura, os tubos ficaram à temperatura ambiente por 10 minutos e foram submetidos a um sistema de congelamento lento e gradual (Thermo Scientific™ Mr. Frosty™) de 22 °C a -30 °C em 60 minutos. Esse sistema consiste em um recipiente com álcool isopropílico, que quando colocado em um freezer a -80 °C, permite uma taxa de congelamento constante de -1 °C por minuto, adequada para a preservação celular. Na sequência, as amostras foram transferidas ao nitrogênio líquido (a -196 °C), em que ficaram armazenadas por cerca de 6 meses.

O processo de descongelamento se deu por meio da retirada dos criotubos do nitrogênio líquido e exposição por dois minutos à temperatura ambiente, a fim de vaporizar o nitrogênio líquido restante. Após, os criotubos foram mantidos em banho-maria a 37 °C por cinco minutos e então centrifugados a 2000 rpm durante dois minutos, a fim separar os agentes crioprotetores para a sua retirada das amostras.

Avaliação da atividade de Glicerol 3-Fosfato Desidrogenase (GPDH)

A Glicerol 3-Fosfato Desidrogenase (GPDH) foi escolhida como parâmetro de avaliação da atividade do tecido adiposo antes e após a criopreservação em nosso estudo, pois

essa enzima é uma peça-chave para o metabolismo de lipídeos e carboidratos. A detecção em altos níveis dessa enzima significa melhores funções celulares e portanto a preservação da atividade e viabilidade do tecido ²². De acordo com as informações do fabricante, o ensaio colorimétrico de atividade enzimática *Glycerol 3-Phosphate Dehydrogenase Activity Colorimetric Assay Kit* (Sigma-Aldrich, MAK208), permite a detecção da atividade de GPDH em diferentes tecidos e células por meio da medida colorimétrica da concentração de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina (NADH) formado pela amostra em dois diferentes tempos de avaliação (0 minutos e 60 minutos) a partir da leitura em espectrofotômetro a 450 nm. A concentração de NADH foi calculada a partir da equação da reta determinada pelos valores de absorbância obtidos pela curva padrão (0, 2,5, 5, 7,5, 10, 12,5 nmol/poço) de NADH.

Isolamento e cultivo das células-tronco mesenquimais

A fim de realizar a expansão das células-tronco mesenquimais provenientes do tecido adiposo, cerca de 30 mL de tecido adiposo fresco lipoaspirado foi misturado a 30 mg de colagenase do tipo IA diluída em 30 mL de DMEM (meio de Dulbecco modificado por Eagle) durante 45 minutos a 37 °C sob agitação leve com o propósito de realizar a digestão do colágeno presente no tecido. Após, foi adicionado o meio de inativação, composto de 54 mL de DMEM e 6 mL de soro fetal bovino (SFB), para cessar a atividade da colagenase e todo o material foi centrifugado a 1000 x g durante 10 minutos para isolar as células da matriz extracelular, que decantam no fundo do frasco por serem menos densas. O precipitado foi ressuscitado em DMEM e novas centrifugações ocorreram até os outros tipos celulares serem eliminados e o sobrenadante ficar límpido. Ao final da última centrifugação, o *pellet* celular da fração estromal vascular foi ressuscitado no meio de troca (DMEM, 10% SFB e 1% Canamicina) e transferido a garrafas de cultura de células, as quais foram incubadas a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂. A cada 24h ou 72h, as células não-aderentes foram removidas pela troca do meio de cultura e as células aderentes foram tripsinizadas (solução de tripsina 0,05% a 37 °C durante 5 minutos) sempre que apresentassem semiconfluência. Uma população de células homogêneas foi obtida cerca de 4 semanas após o início do cultivo celular.

Diferenciação celular

Após a terceira passagem, as células foram transferidas a três diferentes placas de cultura de 96 poços, onde foram plaqueadas em duplicata na concentração de 1×10^3 células/cm² com seus respectivos controles. Cada uma das placas recebeu um meio de diferenciação distinto (adipogênico, osteogênico e condrogênico), enriquecidos com os fatores necessários para a

indução da diferenciação celular. As trocas de meio de todas as placas ocorreram a cada 24h ou 72h.

Aos 9 dias de cultura, a placa suplementada com o meio de diferenciação adipogênico foi lavada com PBS, fixada com paraformaldeído (PFA) 10% e corada durante 30 minutos com Oil Red O, um corante específico para a coloração dos vacúolos de gordura dos adipócitos. No 21º dia de cultura, o mesmo procedimento de lavagem, fixação e coloração foi realizado com as placas restantes, mas utilizando os corantes Alcian Blue 1%, responsável por corar os proteoglicanos sintetizados pelos condrócitos, e o Alizarin Red S 2%, responsável pela coloração do cálcio extracelular sintetizado pelos osteócitos. Todas as células foram analisadas por microscopia invertida e as imagens capturadas no aumento de 250x.

Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o software SPSS versão 22.0 [PASW Statistics for Windows, Chicago: SPSS Inc.] e os dados quantitativos foram expressos como média \pm DP (desvio padrão) ou variação interquartil (IQR) de acordo com o teste de normalidade Shapiro-Wilk. A comparação da atividade enzimática entre os grupos foi realizada por meio do teste de Análise de Variância de 1 via (One-Way ANOVA) para amostras independentes com *post hoc* Tukey. Um valor *P* menor que 0,05 ($P < 0,05$) foi considerado estatisticamente significativo.

RESULTADOS

Avaliação da atividade de GPDH

A idade média das doze pacientes que fizeram parte desse estudo foi de $52,50 \pm 7,92$ anos (faixa de 44 a 69 anos), sendo a maioria delas diagnosticada com neoplasia maligna da mama com lesão invasiva. A média do período de criopreservação de cada amostra de tecido adiposo foi de 6,5 meses (IQR: 6,0 a 8,0).

O ensaio de GPDH foi utilizado nesse estudo para avaliar a função celular do tecido adiposo nas amostras de tecido fresco e nas amostras de tecido criopreservado por 6 meses com os diferentes agentes crioprotetores DMSO 0,5 M + trealose 0,2 M e trealose 0,35 M. Quanto maiores os níveis de atividade dessa enzima detectados, maior o indicativo de preservação das funções celulares dos adipócitos presentes no tecido. A maior atividade de GPDH foi detectada no grupo de tecido fresco ($0,049 \pm 0,0007$ mU/mL), enquanto o grupo DMSO 0,5 + trealose

0,2 apresentou a atividade mais baixa ($0,044 \pm 0,0019$ mU/mL) e o grupo de apenas trealose 0,35 apresentou um valor médio entre eles ($0,047 \pm 0,0048$ mU/mL). Quando os grupos foram comparados entre si, não foi detectada diferença estatística significativa ($P 0,257$) (Figura 1).

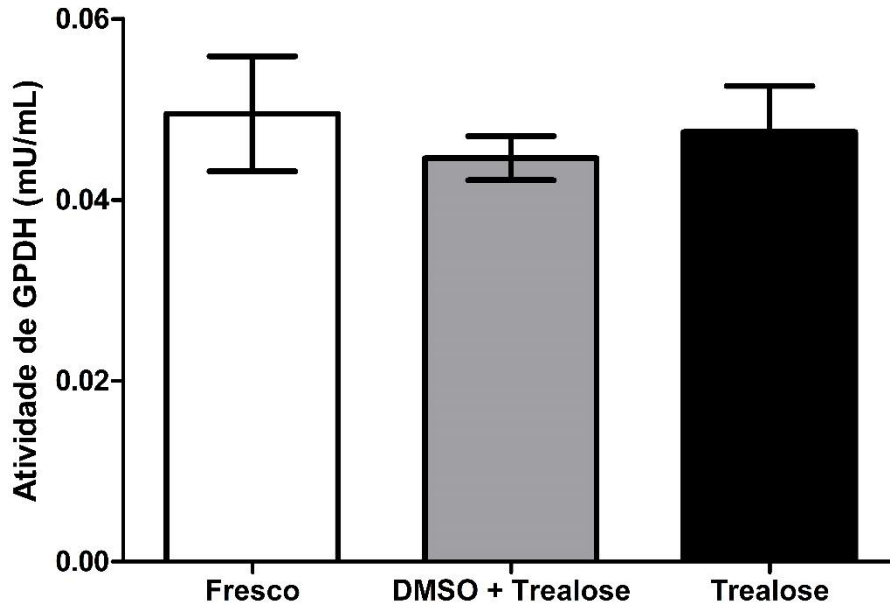


FIGURA 1. Avaliação de viabilidade celular do tecido adiposo por meio da quantificação da atividade de GPDH no tecido fresco ($0,049 \pm 0,0007$ mU/mL, $n = 2$) e no tecido criopreservado por 6 meses com DMSO 0,5 M + trealose 0,2 M ($0,044 \pm 0,0019$ mU/mL, $n = 5$) e apenas com trealose 0,35 M ($0,047 \pm 0,0048$ mU/mL, $n = 6$). Quando comparados entre si, os grupos não apresentaram diferença estatisticamente significativa ($P 0,257$).

Na tentativa de aumentar o número amostral do experimento de 8 para 12 pacientes, um novo experimento foi realizado para a avaliar a atividade enzimática de GPDH do tecido de novas pacientes. No entanto, devido a problemas alheios à pesquisa, os resultados foram muito baixos e incompatíveis com o experimento anterior. Os grupos de tecido adiposo fresco ($0,0090$ mU/mL) e apenas trealose 0,35 M ($0,088 \pm 0,0015$ mU/mL) apresentaram valores de atividade para a GPDH muito baixos, enquanto o grupo de DMSO 0,5 M + trealose 0,2 M ($0,182 \pm 0,0108$ mU/mL) apresentou valores muito altos em comparação a eles, devido a um também alto desvio padrão. Mesmo com a alta diferença entre os grupos, quando comparados entre si, também não apresentaram diferença estatística significativa ($P 0,265$) (Figura 2).

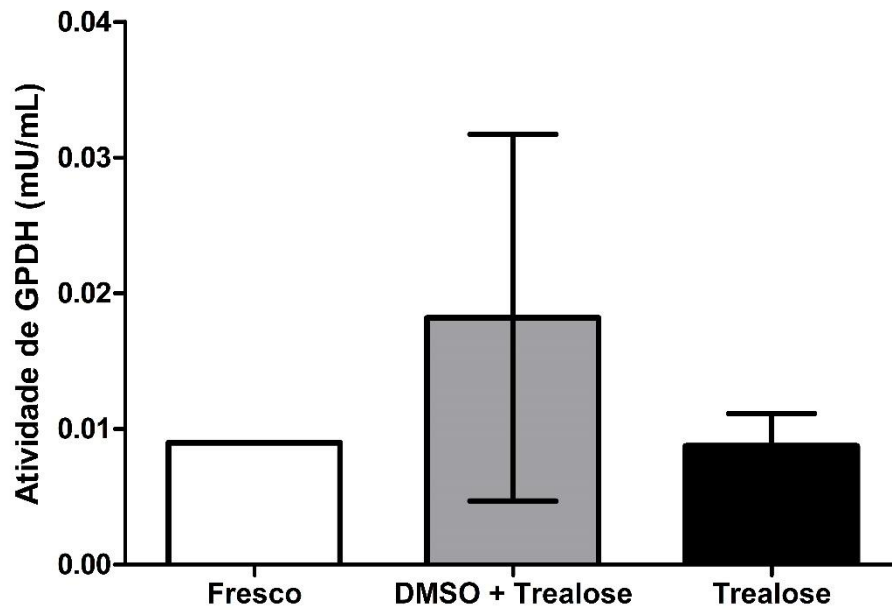


FIGURA 2. Avaliação de viabilidade celular do tecido adiposo por meio da quantificação da atividade de GPDH. A avaliação foi realizada no tecido fresco (0,0090 mU/mL, $n = 1$) e no tecido criopreservado por 6 meses com DMSO 0,5 M + trealose 0,2 M (0,182 ± 0,0108 mU/mL, $n = 5$) e apenas com trealose 0,35 M (0,088 ± 0,0015 mU/mL, $n = 4$). Quando comparados entre si, os grupos não apresentaram diferença estatisticamente significativa ($P 0,265$).

Isolamento e diferenciação de células-tronco mesenquimais

Uma população homogênea de células-tronco mesenquimais foi obtida a partir do plaqueamento da suspensão celular proveniente do isolamento da fração estromal vascular de tecido adiposo de origem abdominal. Sua caracterização ocorreu por meio da identificação de particularidades determinadas pela literatura, como capacidade de aderência e expansão em superfícies plásticas e morfologia do tipo fibroblástica. Após 7 dias do início da cultura, a expansão e a morfologia característica das células já eram evidentes (Figura 3A). Com o passar do tempo, as células foram tornando-se homogêneas morfolologicamente devido à redução das células hematopoiéticas e de outras células estromais do tecido adiposo (Figura 3B).

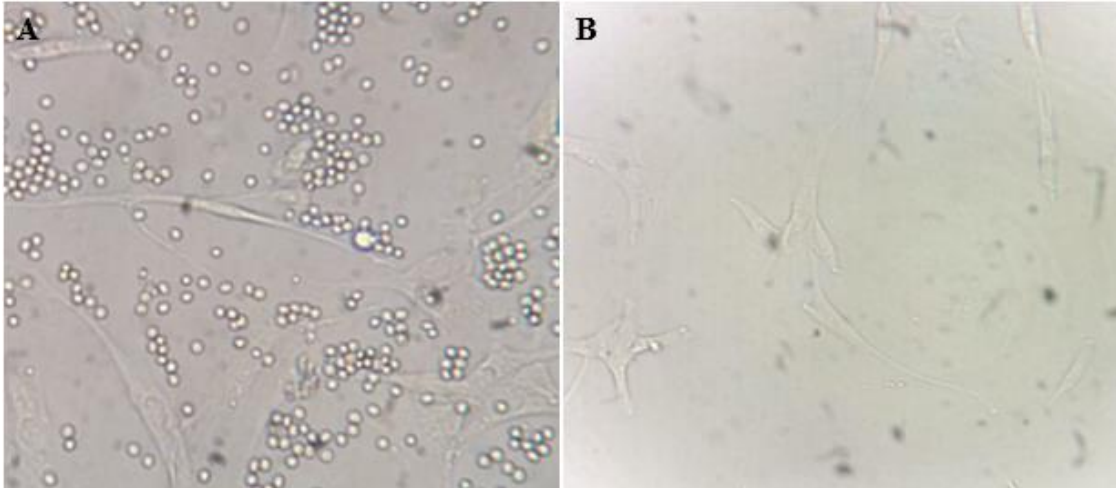


FIGURA 3. Imagens de microscopia das células-tronco mesenquimais indiferenciadas após 7 (A) e 19 (B) dias de cultivo celular, evidenciando a morfologia do tipo fibroblastóide das células aderentes. Magnificação de 250x.

Após a terceira passagem, as células foram testadas quanto à sua capacidade de diferenciação em outros tipos celulares de linhagem mesenquimal quando em condições apropriadas ao seu desenvolvimento. Depois de 9 dias em meio com os nutrientes necessários para a diferenciação adipogênica, as células apresentaram vacúolos lipídicos intracelulares que foram corados pelo *Oil Red O* (Figura 4B). As células suplementadas com o meio de diferenciação osteogênico foram coradas após 21 dias com o corante *Alizarin Red S*, evidenciando a secreção de cálcio decorrente da sua diferenciação em células indispensáveis para a manutenção da matriz óssea (Figura 4D). Por fim, após 21 dias em meio condrogênico, as células foram coradas com *Alcian Blue* e apresentaram uma modesta secreção de componentes da matriz cartilaginosa (Figura 4F). De acordo com o conjunto desses resultados, a população foi homogênea e pode ser considerada de células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo.

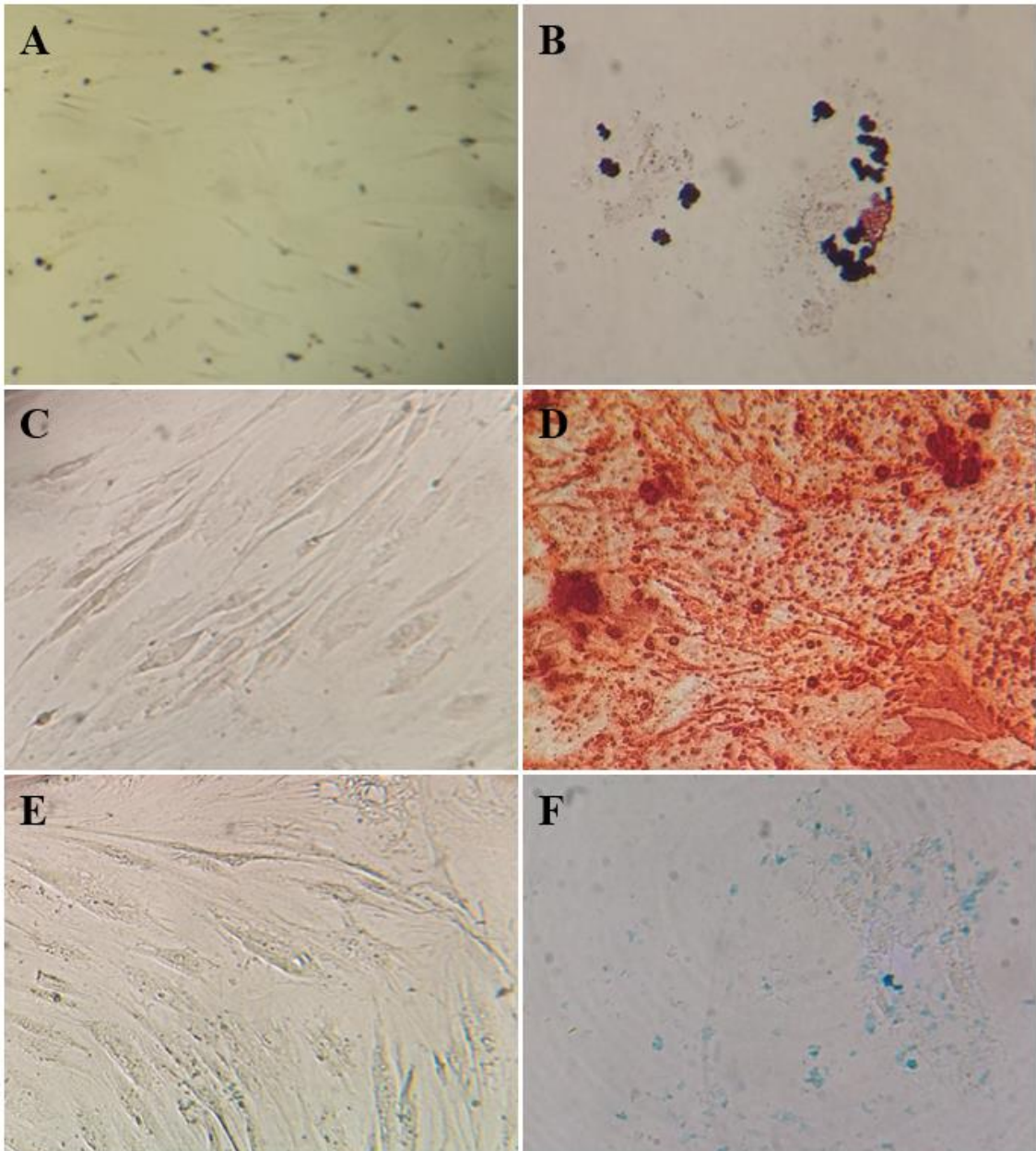


FIGURA 4. Imagens de microscopia das células-tronco diferenciadas e seus respectivos controles (A, C e E). (B) Vacúolos de gordura de adipócitos corados com *Oil Red O* após 9 dias de cultivo. (D) Depósitos de cálcio na matriz extracelular decorrente da atividade de osteócitos corados com *Alizarin Red S* após 21 dias de cultivo. (F) Depósitos de proteoglicanos na matriz extracelular decorrente da atividade de condrócitos corados com *Alcian Blue* 21 dias após o início da diferenciação celular. Magnificação de 250x.

DISCUSSÃO

Constituídas principalmente pelos tecidos adiposo, glandular e conjuntivo, as mamas são órgãos sensíveis à atividade de hormônios como o estrogênio e a progesterona e locais suscetíveis ao desenvolvimento de diversas patologias, como o câncer. Cerca de 1 em cada 4

casos de câncer em mulheres são em decorrência do câncer de mama, que é o tipo de câncer mais diagnosticado em mais de 150 países e a principal causa de morte por câncer em 100 deles.²³ Com o aumento da ocidentalização mundial e conseqüentemente da prática de hábitos menos saudáveis, é visto um crescente aumento anual no número de casos de pacientes diagnosticadas com câncer de mama, especialmente nos países menos desenvolvidos e que não possuem uma política forte de saúde pública capaz de alcançar as populações mais carentes e necessitadas. Ao mesmo passo, também aumentam os progressos na tecnologia dos métodos de detecção precoce da doença e de seus tratamentos, assim como há um crescente avanço na conscientização da população quanto a necessidade da realização de exames periódicos de rastreamento. Em conjunto, todos esses fatores nos mostram que, apesar do número total de diagnósticos estar em crescimento, muitos esforços estão sendo feitos objetivando a detecção do câncer em seus estágios iniciais, o que aumenta consideravelmente as suas chances de recuperação. Esses casos precisam de intervenções menos graves e são responsáveis por um aumento no número de sobreviventes, o que conseqüentemente gera uma demanda por técnicas cirúrgicas menos radicais, que ofereçam à paciente uma qualidade de vida melhor após a cirurgia e com resultados estéticos que não afetem a sua autoestima.

A lipoenxertia surgiu nesse campo como uma técnica inovadora, capaz de corrigir as perdas de volume, forma, projeção e sensibilidade da mama causadas pelas demais técnicas e apresentar baixas taxas de complicação e excelente aceitação por parte das pacientes submetidas a ela.³ No entanto, a principal barreira que impossibilita a ampla realização dessa técnica e a obtenção de resultados ainda melhores é a incapacidade de armazenar de forma adequada o tecido adiposo por longos períodos, tornando necessária a submissão das pacientes a recorrentes procedimentos de lipoaspiração e aumentando a morbidade da técnica. Diversos estudos avaliaram ao longo das duas últimas décadas a execução de protocolos de criopreservação a longo período do tecido adiposo.^{8,18,21,22,24} A chave para o sucesso dessa técnica é a escolha dos agentes crioprotetores corretos na concentração adequada, a fim de minimizar a formação de cristais de gelo que possam romper as membranas celulares durante as etapas de congelamento e descongelamento. Uma combinação adequada para a preservação das características do tecido é a utilização em conjunto de crioprotetores intracelulares, como o DMSO a 0,5 M, e crioprotetores extracelulares, como a trealose a 0,2 M.⁹ No entanto, devido à toxicidade que o DMSO exerce sobre as células vivas mesmo em baixas concentrações quando em temperatura ambiente, torna-se necessária a sua remoção completa do material biológico antes da realização de enxertos, favorecendo a indução de danos e morte celular pelas consecutivas centrifugações pelas quais o tecido é submetido para separá-lo. Sabendo disso, a criopreservação do tecido

adiposo obtido por meio de lipoaspiração convencional foi testada utilizando apenas a trealose, que não possui potencial tóxico, como agente crioprotetor em diversas concentrações, apresentando sua atividade ótima de preservação do tecido na concentração de 0,35 M.¹⁸

Por meio de nosso estudo, não apenas confirmamos os resultados da literatura, como também padronizamos um protocolo de criopreservação do tecido adiposo e isolamento de suas células-tronco mesenquimais que é acessível e pode ser reproduzido em centros hospitalares para aplicação em procedimentos terapêuticos futuros. Com os resultados da avaliação da atividade de GPDH, mostramos que mesmo após 6 meses de criopreservação as células adiposas provenientes da lipoaspiração do tecido adiposo subcutâneo abdominal coletadas por meio da técnica de Coleman^{19,20} mantêm sua atividade e viabilidade celular após o descongelamento quando criopreservadas com trealose na concentração de 0,35 M quase tão bem quanto o próprio tecido fresco. O sucesso da criopreservação do tecido adiposo sem a necessidade da utilização de agentes crioprotetores com potencial tóxico representa um grande avanço para as técnicas de reconstrução de tecidos e órgãos, como a lipoenxertia nas mamas. A possibilidade de armazenamento a longo prazo faz com que seja possível a criação de bancos de estocagem do tecido adiposo, permitindo que após uma única lipoaspiração seja coletado material suficiente para procedimentos adicionais para a correção de defeitos menores decorrentes da reabsorção do tecido adiposo. Sem a necessidade de novas lipoaspirações a cada procedimento, uma série de outras vantagens também podem ser alcançadas, como a possibilidade dos procedimentos de lipoenxertia ocorrerem de forma ambulatorial, a redução dos custos e do período de recuperação das pacientes e a diminuição da morbidade da técnica, pois não são causados novos traumatismos à área doadora do tecido pelos procedimentos recorrentes.

Igualmente encorajadores, nossos resultados positivos na padronização do isolamento, expansão e diferenciação das células-tronco mesenquimais provenientes do tecido adiposo representam um impulso promissor nas técnicas de medicina regenerativa devido ao potencial terapêutico dessas células. Por meio de um protocolo específico, realizamos a separação das células-tronco mesenquimais presentes na fração estromal vascular do tecido adiposo e promovemos sua expansão *in vitro* durante quatro semanas, período em que essas células mostraram capacidade de aderência ao plástico e a morfologia fibroblastóide característica de células-tronco. Quando induzidas pelo meio adequado, essas células mostraram capacidade de diferenciação em outros tipos celulares, confirmando sua multipotencialidade. Apesar da baixa celularidade presente nos meios de diferenciação em adipócitos e condrócitos, com o uso da coloração adequada torna-se possível visualizar a formação de produtos característicos dessas

células, como vacúolos lipídicos e proteoglicanos do tecido conjuntivo, respectivamente. Mais expressiva, no entanto, foi a transformação das células indiferenciadas em osteócitos, confirmadas pela secreção em grande quantidade de cálcio na matriz extracelular. Esses resultados nos mostram que o tecido adiposo, que é abundante em várias regiões do corpo e pode ser extraído sem maiores dificuldades, é uma grande fonte de células-tronco mesenquimais, oferecendo uma maior quantidade de células e com uma taxa de isolamento muito maior que a própria medula óssea.^{14,25}

Se comprovada a capacidade de criopreservação adequada dessas células com agentes crioprotetores não tóxicos, de forma a manter sua viabilidade celular e seu potencial de diferenciação, assim como os adipócitos avaliados nesse estudo, tais células poderiam ser suplementadas ao tecido adiposo antes da realização do seu enxerto, de forma a combinar as vantagens que os dois tipos celulares têm a oferecer. Por meio da secreção de diversas substâncias, como as adipocinas e os prostanoídes, o tecido adiposo atua de forma autócrina e parácrina, regulando uma série de processos metabólicos²⁶⁻²⁸, que quando somados à atividade secretora de fatores angiogênicos e antiapoptóticos das células-tronco mesenquimais¹⁵, poderia promover mais facilmente a revascularização dos tecidos durante a lipoenxertia da mama, diminuindo assim a ocorrência de atrofia e a formação de cistos necróticos e promovendo uma melhor aceitação do tecido.

CONCLUSÃO

Por meio de seus resultados, o presente estudo indica que a criopreservação do tecido adiposo subcutâneo abdominal coletado segundo a técnica de Coleman mantém adequadamente a atividade enzimática de GPDH, um importante intermediário do metabolismo dos lipídeos e carboidratos, preservando a atividade e a viabilidade dos adipócitos devido ao efeito protetivo que a trealose exerce na concentração de 0,35 M. Ademais, também padronizamos um protocolo acessível e reprodutível de isolamento, expansão e diferenciação das células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo, que por meio de estudos futuros serão testadas quanto à sua viabilidade e capacidade de diferenciação após a criopreservação com trealose, a fim de serem suplementadas à camada de adipócitos viáveis após a criopreservação para o aperfeiçoamento das técnicas de lipoenxertia.

REFERÊNCIAS

1. Neuber F. Fat grafting. *Cuir Kongr Verh Otsum Ges Chir.* 1893;20(66):263-267.
2. Illouz YG. Present results of fat injection. *Aesthetic Plast Surg.* 1988;12(3):175-181.
3. Delay E, Garson S, Tousson G, Sinna R. Fat Injection to the Breast: Technique, Results, and Indications Based on 880 Procedures Over 10 Years. *Aesthetic Surg J.* 2009;29(5):360-376. doi:10.1016/j.asj.2009.08.010
4. Hivernaud V, Lefourn B, Guicheux J, et al. Autologous Fat Grafting in the Breast: Critical Points and Technique Improvements. *Aesthetic Plast Surg.* 2015;39(4):547-561. doi:10.1007/s00266-015-0503-y
5. Kaufman MR, Bradley JP, Dickinson B, et al. Autologous fat transfer national consensus survey: Trends in techniques for harvest, preparation, and application, and perception of short- and long-term results. *Plast Reconstr Surg.* 2007;119(1):323-331. doi:10.1097/01.prs.0000244903.51440.8c
6. Pu LLQ, Coleman SR, Cui X, Ferguson REH, Vasconez HC. Autologous fat grafts harvested and refined by the coleman technique: A comparative study. *Plast Reconstr Surg.* 2008;122(3):932-937. doi:10.1097/PRS.0b013e3181811ff0
7. Rietjens M, De Lorenzi F, Rossetto F, et al. Safety of fat grafting in secondary breast reconstruction after cancer. *J Plast Reconstr Aesthetic Surg.* 2011;64(4):477-483. doi:10.1016/j.bjps.2010.06.024
8. Cui XD, Gao DY, Fink BF, Vasconez HC, Pu LLQ. Cryopreservation of human adipose tissues. *Cryobiology.* 2007;55(3):269-278. doi:10.1016/j.cryobiol.2007.08.012
9. Pu LLQ, Cui X, Fink BF, Cibull ML, Gao D. Long-term preservation of adipose aspirates after conventional lipoplasty. *Aesthetic Surg J.* 2004;24(6):536-541. doi:10.1016/j.asj.2004.09.002
10. Pu LLQ, Cui X, Fink BF, Gao D, Vasconez HC. Adipose aspirates as a source for human processed lipoaspirate cells after optimal cryopreservation. *Plast Reconstr Surg.* 2006;117(6):1845-1850. doi:10.1097/01.prs.0000209931.24781.9c
11. Castro SV, Carvalho A de A, da Silva CMG, Faustino LR, da Figueiredo JR, Rodrigues APR. Agentes crioprotetores intracelulares: características e utilização na criopreservação de tecido ovariano e oócitos. *Acta Sci Vet.* 2011;39(2):1-18.
12. Pegg DE. The History and Principles of Cryopreservation. *Semin Reprod Med.* 2002;20(1):005-014. doi:10.1055/s-2002-23515
13. Zhang M, Oldenhof H, Sieme H, Wolkers WF. Freezing-induced uptake of trehalose

- into mammalian cells facilitates cryopreservation. *Biochim Biophys Acta - Biomembr.* 2016;1858(6):1400-1409. doi:10.1016/j.bbamem.2016.03.020
14. Fraser JK, Wulur I, Alfonso Z, Hedrick MH. Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology. *Trends Biotechnol.* 2006;24(4):150-154. doi:10.1016/j.tibtech.2006.01.010
 15. Cao Y, Sun Z, Liao L, Meng Y, Han Q, Zhao RC. Human adipose tissue-derived stem cells differentiate into endothelial cells in vitro and improve postnatal neovascularization in vivo. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;332(2):370-379. doi:10.1016/j.bbrc.2005.04.135
 16. Nowak W, Dulak J, Józkwicz A, Szade K, Szade A. Adult stem cells: hopes and hypes of regenerative medicine. *Acta Biochim Pol.* 2015;62(3):329-337. doi:10.18388/abp.2015_1023
 17. Weissman IL. Stem cells: Units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell.* 2000;100(1):157-168. doi:10.1016/S0092-8674(00)81692-X
 18. Cui X, Pu LLQ. The Search for a Useful Method for the Optimal Cryopreservation of Adipose Aspirates: Part I. In Vitro Study. *Aesthetic Surg J.* 2009;29(3):248-252. doi:10.1016/j.asj.2009.02.016
 19. Coleman SR. Hand Rejuvenation from Fat Grafting. *Plast Reconstr Surg.* 2002;110(7):1731-1744. doi:10.1097/01.PRS.0000033936.43357.08
 20. Coleman SR. Facial recontouring with lipostructure. *Clin Plast Surg.* 1997;24(2):347-367. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9142473>.
 21. Pu LLQ, Coleman SR, Cui X, Ferguson REH, Vasconez HC. Cryopreservation of autologous fat grafts harvested with the coleman technique. *Ann Plast Surg.* 2010;64(3):333-337. doi:10.1097/SAP.0b013e3181b022cb
 22. Pu LLQ, Cui X, Fink BF, et al. The viability of fatty tissues within adipose aspirates after conventional liposuction: A comprehensive study. *Ann Plast Surg.* 2005;54(3):288-292. doi:10.1097/01.sap.0000153147.23088.cb
 23. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2018;68(6):394-424. doi:10.3322/caac.21492
 24. Pu LLQ, Cui X, Fink BF, Cibull ML, Gao D. Cryopreservation of adipose tissues: The role of trehalose. *Aesthetic Surg J.* 2005;25(2):126-131. doi:10.1016/j.asj.2005.01.003
 25. Kern S, Eichler H, Stoeve J, Klüter H, Bieback K. Comparative Analysis of

- Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow, Umbilical Cord Blood, or Adipose Tissue. *Stem Cells*. 2006;24(5):1294-1301. doi:10.1634/stemcells.2005-0342
26. Esteve Ràfols M. Adipose tissue: Cell heterogeneity and functional diversity. *Endocrinol y Nutr (English Ed)*. 2014;61(2):100-112. doi:10.1016/j.endoen.2014.02.001
27. Masuzaki H, Paterson J, Shinyama H, et al. A transgenic model of visceral obesity and the metabolic syndrome. *Science (80-)*. 2001;294(5549):2166-2170. doi:10.1126/science.1066285
28. Trayhurn P. Endocrine and signalling role of adipose tissue: new perspectives on fat. *Acta Physiol Scand*. 2005;184(4):285-293. doi:10.1111/j.1365-201X.2005.01468.x

5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

A partir dos resultados obtidos neste trabalho, podemos concluir que a criopreservação do tecido adiposo, coletado a partir de um protocolo específico de lipoaspiração, pode ser realizada por períodos prolongados com a utilização de agentes crioprotetores que não apresentem potencial tóxico aos materiais biológicos quando em temperatura ambiente. Tal resultado reforça a possibilidade e a necessidade de estocagem do tecido adiposo em bancos específicos após um único procedimento de lipoaspiração para utilização em procedimentos terapêuticos futuros. Por meio do armazenamento do tecido adiposo uma série de vantagens podem ser alcançadas, como a obtenção de resultados mais satisfatórios nas cirurgias de reconstrução das mamas pela diminuição dos danos causados à região doadora do tecido a ser enxertado; a redução do tempo e dos custos da cirurgia, uma vez que sem a necessidade de novas lipoaspirações as cirurgias corretivas podem ocorrer de forma ambulatorial, com o uso de anestesia local; e a recuperação das pacientes de forma muito mais rápida.

Por meio do sucesso na padronização do isolamento e expansão *in vitro* das CTM derivadas do tecido adiposo também tornamos possível a realização de uma série de novos estudos que possam contribuir com melhores resultados às técnicas de reconstrução de tecidos e órgãos. Entre elas encontra-se a necessidade de avaliar se após a criopreservação com a trealose a atividade endócrina de secreção de fatores angiogênicos e antiapoptóticos e a multipotencialidade de diferenciação dessas células em diferentes tipos celulares são mantidas, permitindo sua aplicação à técnica da lipoenxertia buscando o alcance de resultados sinérgicos.

REFERÊNCIAS

- BRAY, F. et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: a cancer journal for clinicians**, [s. l.], v. 68, n. 6, p. 394–424, 2018.
- CANNON, B.; NEDERGAARD, J. Brown Adipose Tissue: Function and Physiological Significance. **Physiological Reviews**, [s. l.], v. 84, n. 1, p. 277–359, 2004.
- CAO, Y. et al. Human adipose tissue-derived stem cells differentiate into endothelial cells in vitro and improve postnatal neovascularization in vivo. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [s. l.], v. 332, n. 2, p. 370–379, 2005.
- CASTRO, S. V. et al. Agentes crioprotetores intracelulares: características e utilização na criopreservação de tecido ovariano e oócitos. **Acta Scientiae Veterinariae**, [s. l.], v. 39, n. 2, p. 1–18, 2011.
- CHIRAPPAPHA, P. et al. Evaluation of lipofilling safety in elderly patients with breast cancer. **Plastic and Reconstructive Surgery - Global Open**, [s. l.], v. 3, n. 7, p. 1–7, 2015.
- CLOUGH, K. B. et al. Improving breast cancer surgery: A classification and quadrant per quadrant atlas for oncoplastic surgery. **Annals of Surgical Oncology**, [s. l.], v. 17, n. 5, p. 1375–1391, 2010.
- CLOUGH, K. B. et al. Long-term Results after Oncoplastic Surgery for Breast Cancer: A 10-year Follow-up. **Annals of Surgery**, [s. l.], v. 268, n. 1, p. 165–171, 2018.
- COLEMAN, S. R. Long-Term survival of fat transplants: Controlled demonstrations. **Aesthetic Plastic Surgery**, [s. l.], v. 19, n. 5, p. 421–425, 1995.
- COLEMAN, S. R. Facial recontouring with lipostructure. **Clinics in plastic surgery**, [s. l.], v. 24, n. 2, p. 347–67, 1997.
- COSTANTINI, M. et al. Radiological findings in mammary autologous fat injections: A multi-technique evaluation. **Clinical Radiology**, [s. l.], v. 68, n. 1, p. 27–33, 2013.
- CUI, X. D. et al. Cryopreservation of human adipose tissues. **Cryobiology**, [s. l.], v. 55, n. 3, p. 269–278, 2007.
- CUI, X.; PU, L. L. Q. The Search for a Useful Method for the Optimal Cryopreservation of Adipose Aspirates: Part I. In Vitro Study. **Aesthetic Surgery Journal**, [s. l.], v. 29, n. 3, p. 248–252, 2009.

DELAY, E. et al. Fat Injection to the Breast: Technique, Results, and Indications Based on 880 Procedures Over 10 Years. **Aesthetic Surgery Journal**, [s. l.], v. 29, n. 5, p. 360–376, 2009.

ERDAG, G. et al. Cryopreservation of fetal skin is improved by extracellular trehalose. **Cryobiology**, [s. l.], v. 44, n. 3, p. 218–228, 2002.

ESTEVE RÀFOLS, M. Adipose tissue: Cell heterogeneity and functional diversity. **Endocrinología y Nutrición (English Edition)**, [s. l.], v. 61, n. 2, p. 100–112, 2014.

FERLAY, J. et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **International journal of cancer**, [s. l.], v. 136, n. 5, p. E359–86, 2015.

FRASER, J. K. et al. Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology. **Trends in Biotechnology**, [s. l.], v. 24, n. 4, p. 150–154, 2006.

GUTOWSKI, K. A. et al. Current applications and safety of autologous fat grafts: A report of the ASPS Fat Graft Task Force. **Plastic and Reconstructive Surgery**, [s. l.], v. 124, n. 1, p. 272–280, 2009.

HIVERNAUD, V. et al. Autologous Fat Grafting in the Breast: Critical Points and Technique Improvements. **Aesthetic Plastic Surgery**, [s. l.], v. 39, n. 4, p. 547–561, 2015.

ILLOUZ, Y. G. Present results of fat injection. **Aesthetic plastic surgery**, [s. l.], v. 12, n. 3, p. 175–81, 1988.

JAIN, J.; PAULSON, R. Oocyte cryopreservation. **Fertility and Sterility**, [s. l.], v. 86, n. 4, p. 1037–1046, 2006.

JANG, T. H. et al. Cryopreservation and its clinical applications. **Integrative Medicine Research**, [s. l.], v. 6, n. 1, p. 12–18, 2017.

KASEM, A. et al. Breast lipofilling: A review of current practice. **Archives of Plastic Surgery**, [s. l.], v. 42, n. 2, p. 126–130, 2015.

KAUFMAN, M. R. et al. Autologous fat transfer national consensus survey: Trends in techniques for harvest, preparation, and application, and perception of short- and long-term results. **Plastic and Reconstructive Surgery**, [s. l.], v. 119, n. 1, p. 323–331, 2007.

KERN, S. et al. Comparative Analysis of Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow, Umbilical Cord Blood, or Adipose Tissue. **Stem Cells**, [s. l.], v. 24, n. 5, p. 1294–1301, 2006.

KERSHAW, E. E.; FLIER, J. S. Adipose tissue as an endocrine organ. **Journal of Clinical**

Endocrinology and Metabolism, [s. l.], v. 89, n. 6, p. 2548–2556, 2004.

LARGE, V. et al. Metabolism of lipids in human white adipocyte. **Diabetes and Metabolism**, [s. l.], v. 30, n. 4, p. 294–309, 2004.

LI, C. I. **Breast cancer epidemiology**. [s.l: s.n.].

MACMILLAN, R. D.; MCCULLEY, S. J. Oncoplastic Breast Surgery: What, When and for Whom? **Current Breast Cancer Reports**, [s. l.], v. 8, n. 2, p. 112–117, 2016.

MAHONEY, C. M. et al. Current therapeutic strategies for adipose tissue defects/repair using engineered biomaterials and biomolecule formulations. **Frontiers in Pharmacology**, [s. l.], v. 9, n. MAY, p. 1–12, 2018.

MALHOTRA, G. K. et al. Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers. **Cancer Biology and Therapy**, [s. l.], v. 10, n. 10, p. 955–960, 2010.

MASUZAKI, H. et al. A transgenic model of visceral obesity and the metabolic syndrome. **Science**, [s. l.], v. 294, n. 5549, p. 2166–2170, 2001.

MERINO BONILLA, J. A.; TORRES TABANERA, M.; ROS MENDOZA, L. H. Breast cancer in the 21st century: from early detection to new therapies. **Radiologia**, [s. l.], v. 59, n. 5, p. 368–379, 2017.

MINTEER, D.; MARRA, K. G.; RUBIN, J. P. Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells: Biology and Potential Applications. In: **Advances in biochemical engineering/biotechnology**. [s.l: s.n.]. v. 123p. 59–71.

NEUBER, F. Fat grafting. **Cuir Kongr Verh Otsum Ges Chir**, [s. l.], v. 20, n. 66, p. 263–7, 1893.

NOWAK, W. et al. Adult stem cells: hopes and hypes of regenerative medicine. **Acta Biochimica Polonica**, [s. l.], v. 62, n. 3, p. 329–337, 2015.

PEGG, D. E. The History and Principles of Cryopreservation. **Seminars in Reproductive Medicine**, [s. l.], v. 20, n. 1, p. 005–014, 2002.

PU, L. L. Q. et al. Long-term preservation of adipose aspirates after conventional lipoplasty. **Aesthetic Surgery Journal**, [s. l.], v. 24, n. 6, p. 536–541, 2004.

PU, L. L. Q. et al. The viability of fatty tissues within adipose aspirates after conventional liposuction: A comprehensive study. **Annals of Plastic Surgery**, [s. l.], v. 54, n. 3, p. 288–292, 2005. a.

PU, L. L. Q. et al. Cryopreservation of adipose tissues: The role of trehalose. **Aesthetic Surgery Journal**, [s. l.], v. 25, n. 2, p. 126–131, 2005. b.

PU, L. L. Q. et al. Adipose aspirates as a source for human processed lipoaspirate cells after optimal cryopreservation. **Plastic and Reconstructive Surgery**, [s. l.], v. 117, n. 6, p. 1845–1850, 2006.

PU, L. L. Q. et al. Autologous fat grafts harvested and refined by the coleman technique: A comparative study. **Plastic and Reconstructive Surgery**, [s. l.], v. 122, n. 3, p. 932–937, 2008.

PU, L. L. Q. et al. Cryopreservation of autologous fat grafts harvested with the coleman technique. **Annals of Plastic Surgery**, [s. l.], v. 64, n. 3, p. 333–337, 2010.

RIETJENS, M. et al. Safety of fat grafting in secondary breast reconstruction after cancer. **Journal of Plastic, Reconstructive and Aesthetic Surgery**, [s. l.], v. 64, n. 4, p. 477–483, 2011.

SCHÄFFLER, A.; BÜCHLER, C. Concise Review: Adipose Tissue-Derived Stromal Cells-Basic and Clinical Implications for Novel Cell-Based Therapies. **Stem Cells**, [s. l.], v. 25, n. 4, p. 818–827, 2007.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2019. **CA: a cancer journal for clinicians**, [s. l.], v. 69, n. 1, p. 7–34, 2019.

STREM, B. M. et al. Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells. **Keio Journal of Medicine**, [s. l.], v. 54, n. 3, p. 132–141, 2005.

TRAYHURN, P. Endocrine and signalling role of adipose tissue: new perspectives on fat. **Acta Physiologica Scandinavica**, [s. l.], v. 184, n. 4, p. 285–293, 2005.

ULLAH, I.; SUBBARAO, R. B.; RHO, G. J. Human mesenchymal stem cells - current trends and future prospective. **Bioscience Reports**, [s. l.], v. 35, n. 2, p. 1–18, 2015.

WAGNER, W. et al. Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. **Experimental Hematology**, [s. l.], v. 33, n. 11, p. 1402–1416, 2005.

WEISSMAN, I. L. Stem cells: Units of development, units of regeneration, and units in evolution. **Cell**, [s. l.], v. 100, n. 1, p. 157–168, 2000.

ZHANG, M. et al. Freezing-induced uptake of trehalose into mammalian cells facilitates cryopreservation. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, [s. l.], v. 1858, n. 6, p. 1400–1409, 2016.

ZHU, Y. et al. Adipose-derived stem cell: a better stem cell than BMSC. **Cell Biochemistry and Function**, [s. l.], v. 26, n. 6, p. 664–675, 2008.

APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Nº do CAAE: 48737415.0.0000.5327

Título do Projeto: Análise da viabilidade das células adiposas criopreservadas: perspectivas clínicas quanto sua aplicação na reconstrução mamária

Você está sendo convidada a participar de um projeto de pesquisa de Doutorado no qual será avaliado se as células adiposas (enxerto de gordura autóloga) permanecem viáveis (com qualidade) após seu armazenamento (congelamento). Pretende-se, a partir dos resultados, desenvolver e padronizar um protocolo para armazenamento das células adiposas. Esta pesquisa está sendo realizada pelo Serviço de Mastologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) e pelo Laboratório de Fisiologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Você está sendo convidada, porque fará uma cirurgia para reparação ou reconstrução mamária com a técnica de lipoenxertia (enxerto de gordura lipoaspirada da própria paciente), que será realizada pela equipe de mastologistas deste serviço.

Justificativa para a realização deste estudo:

O uso do enxerto de gordura lipoaspirado da própria paciente para a reconstrução mamária, após alguma deformidade resultante de cirurgias prévias na mama e/ou radioterapia, é uma opção viável, que traz resultados estéticos satisfatórios com melhora do volume, forma e simetria das mamas. Porém, parte desta gordura enxertada é absorvida, causando a necessidade, em muitos casos, da realização de mais de uma cirurgia no local da reconstrução sob anestesia geral.

Há um grande interesse em desenvolver uma técnica eficaz para o armazenamento, em longo prazo, da gordura retirada da paciente para uso futuro na mesma paciente, possibilitando novas reconstruções e correções de sequelas cirúrgicas e pós-radioterapia sem a necessidade de outra lipoaspiração. Isto irá possibilitar a realização de novas lipoenxertias, na mesma paciente, com menor tempo cirúrgico, menor traumatismo na área doadora, retorno mais rápido da paciente as suas atividades usuais, menos dor no pós-operatório.

Se você aceitar participar da pesquisa, os procedimentos envolvidos em sua participação são os seguintes:

Sua participação no estudo consistirá em permitir, após a coleta do enxerto de gordura durante a cirurgia, a utilização de 30 ml deste material para a pesquisa, o qual será armazenado em biorrepositório do estudo no Laboratório de Fisiologia – Instituto de Ciências Básicas da Saúde/UFRGS. É importante você saber que a técnica utilizada para a coleta do enxerto de gordura será a mesma já utilizada no Serviço de Mastologia do HCPA para todas as pacientes que irão se submeter a este procedimento, independentemente de você aceitar ou não em participar da pesquisa.

Rubrica do participante _____ Rubrica do pesquisador _____

Página 1 de 3

CEP Hospital de Clínicas de Porto Alegre (MR 05/11/2015)

Também faremos uma coleta de dados, em seu prontuário, referente a informações clínicas associadas ao seu histórico de saúde, diagnóstico e tratamento. Por isso, aproveitamos para solicitar sua autorização para este acesso.

Os possíveis riscos ou desconfortos decorrentes da participação na pesquisa são:

Ao aceitar participar do estudo, você não estará sendo exposta a riscos adicionais, quando comparada às pacientes que não tenham aceitado participar do estudo. As amostras de tecido de gordura serão coletadas durante a sua cirurgia de lipoenxertia, e este procedimento da pesquisa não terá influência sobre a mesma. O tecido coletado é uma pequena parte do tecido que é retirado (lipoaspirado) neste tipo de cirurgia e não trará prejuízos ao seu tratamento ou a sua saúde.

Os possíveis benefícios decorrentes da participação na pesquisa são:

Caso tenhamos sucesso no armazenamento da gordura lipoaspirada, um possível benefício a longo prazo para a participante é a possibilidade de usá-la futuramente, se houver necessidade de outros procedimentos para reconstrução mamária.

Sua participação na pesquisa é totalmente voluntária, ou seja, não é obrigatória. Caso você decida não participar, ou ainda, desistir de participar e retirar seu consentimento, não haverá nenhum prejuízo ao atendimento que você recebe ou possa vir a receber na instituição.

Não está previsto nenhum tipo de pagamento pela sua participação na pesquisa e você não terá nenhum custo com respeito aos procedimentos envolvidos.

Caso ocorra alguma intercorrência, resultante de sua participação na pesquisa, você receberá todo o atendimento necessário, sem nenhum custo pessoal.

Os dados coletados durante a pesquisa serão sempre tratados confidencialmente. Os resultados serão apresentados de forma conjunta, sem a identificação dos participantes, ou seja, o seu nome não aparecerá na publicação dos resultados.

O material coletado será armazenado, mas caso você mude de ideia quanto à guarda e utilização do material, seu consentimento pode ser retirado a qualquer momento e, neste caso, a sua amostra será descartada.

Como haverá coleta e armazenamento de material biológico, neste caso tecido de gordura, solicitamos também a sua permissão para usar este material em outras pesquisas futuras. Estas novas pesquisas também serão apresentadas ao Comitê de Ética em Pesquisa. A cada nova pesquisa, você será esclarecida quanto à justificativa e o objetivo da mesma e será solicitado o seu consentimento, sendo contatada para que assine um novo Termo de Consentimento Livre e Esclarecido caso decida participar.

Rubrica do participante _____ Rubrica do pesquisador _____

Página 2 de 3

CEP Hospital de Clínicas de Porto Alegre (MR 05/11/2015)

() Aceito que a amostra coletada seja armazenada apenas para esta pesquisa.

() Aceito que a amostra coletada seja armazenada para pesquisas futuras, sendo chamada a cada nova pesquisa para um novo consentimento.

Caso você tenha dúvidas, poderá entrar em contato com a pesquisadora responsável, Márcia Portela de Melo, pelo telefone (51) 3359-8232 ou no Serviço de Mastologia do HCPA – 6º andar, sala 600 ou com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), pelo telefone (51) 33597640, ou no 2º andar do HCPA, sala 2227, de segunda à sexta, das 8h às 17h.

Esse Termo é assinado em duas vias, sendo uma para a participante e outra para os pesquisadores.

Nome da participante da pesquisa

Assinatura

Nome do pesquisador que aplicou o Termo

Assinatura

Local e Data: _____

Rubrica do participante _____ Rubrica do pesquisador _____

Página 3 de 3

CEP Hospital de Clínicas de Porto Alegre (MR 05/11/2015)

ANEXO B – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA ANNALS OF PLASTIC SURGERY

Annals of Plastic Surgery
Online Submission and Review System

Instructions for Authors

Ethical/Legal Considerations

A submitted manuscript must be an original contribution not previously published (except as an abstract or preliminary report); must not be under consideration for publication elsewhere; and must, if accepted, not be published elsewhere in similar form, in any language, without the consent of Wolters Kluwer. Each person listed as an author is expected to have participated in the study to a significant extent. Although the editors and referees make every effort to ensure the validity of published manuscripts, the final responsibility rests with the authors, not with the Journal, its editors, or the publisher. The editorial office will acknowledge receipt of your manuscript and will give you a manuscript number for reference. Address all inquiries regarding manuscripts not yet accepted or published to the Journal's editorial office. **All manuscripts must be submitted online through the journal's website at <http://sap.edmgr.com>.** See submission instructions under "Online manuscript submission."

Patient anonymity and informed consent

It is the author's responsibility to ensure that a patient's anonymity be carefully protected and to verify that any experimental investigation with human subjects reported in the manuscript was performed with informed consent and following all the guidelines for experimental investigation with human subjects required by the institution(s) with which all the authors are affiliated. The protocol of the study must be approved by the Institutional Review Board (IRB) or the equivalent (eg, Research Ethics Board) where the study is conducted. Written releases from patients must accompany photographs in which the identity of the patient can be recognized. In the absence of such a release, an image must be cropped or partially obscured to the extent that the patient cannot be identified. Covering the eyes in a full-face photograph is not sufficient.

Conflicts of Interest and Copyright Transfer

Authors must state all possible conflicts of interest in the manuscript, including financial, consultative, institutional, and other relationships that might lead to bias or conflict of interest. If there is no conflict of interest, this should also be explicitly stated as "none declared." All sources of funding should be acknowledged in the manuscript. All relevant conflicts of interest and sources of funding should be included on the title page of the manuscript under the heading, "Conflicts of Interest and Source of Funding." For example:

Conflicts of Interest and Source of Funding: A has received honoraria from Company Z. B is currently receiving a grant (#12345) from Organization Y, and is on the speakers' bureau for Organization X – the CME organizers for Company A. For the remaining authors none were declared.

In addition, each author must complete and submit the journal's copyright transfer agreement, which includes a section on the disclosure of potential conflicts of interest based on the recommendations of the International Committee of Medical Journal Editors, "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals" (www.icmje.org/update.html).

A copy of the form is made available to the submitting author within the Editorial Manager submission process. Co-authors will automatically receive an e-mail with instructions on completing the form upon submission.

Compliance with NIH and Other Research Funding Agency Accessibility Requirements

A number of research funding agencies now require or request authors to submit the post-print (the article after peer review and acceptance but not the final published article) to a repository that is accessible online by all without charge. As a service to our authors, Wolters Kluwer will identify to the National Library of Medicine (NLM) articles that require deposit and will transmit the post-print of an article based on research funded in whole or in part by the National Institutes of Health, Wellcome Trust, Howard Hughes Medical Institute, or other funding agencies to PubMed Central. The Copyright Transfer Agreement provides the mechanism.

Permissions

Authors must submit written permission from the copyright owner (usually the publisher) to use direct quotations, tables, or illustrations that have appeared in copyrighted form elsewhere, along with complete details about the source. Any permissions fees that might be required by the copyright owner are the responsibility of the authors requesting use of the borrowed material, not the responsibility of Wolters Kluwer.

Clinical Trials

Manuscripts based on a prospective clinical trial should document the registration of the clinical trial. If the trial is not registered, the authors should provide reasons for this omission. The final decision of the relevance of trial registration to any manuscript will be made by the editor.

Manuscript Submission

Online manuscript submission

All manuscripts must be submitted on line through the Web site: <http://sap.edmgr.com>. **First-time users:** Please click the Register button from the menu and enter the requested information. On successful registration, you will be sent an e-mail indicating your user name and password. Print a copy of this information for future reference. Note: If you have received an e-mail from us with an assigned user ID and password, or if you are a repeat user, do not register again; simply log in. Once you have an assigned ID and password, you do not have to re-register, even if your status changes (that is, author, reviewer, or editor). **Authors:** Please click the log-in button from the menu at the top of the page and log into the system as an Author. Submit your manuscript according to the author instructions. You will be able to track the progress of your manuscript through the system. If you experience any problems, please contact: Jane Wood, Managing Editor, *Annals of Plastic Surgery*, e-mail: willhermyone@aol.com, or William C. Lineaweaver, MD, FACS, Editor-in-Chief, *Annals of Plastic Surgery*, e-mail: william.lineaweaver@jmsburncenters.com

Preparation of Manuscript

Manuscripts that do not adhere to the following instructions will be returned to the corresponding author for technical revision before undergoing peer review.

Articles submitted to the journal must be written with a solid basis of English language. If you need assistance in this area, listed below are a few companies who provide language and copyediting services. Use of an editorial service is at the discretion and cost of the authors, and will not guarantee acceptance for publication in the journal.

Please note: Appearance in the list of vendors does not represent endorsement by the publisher. Authors are encouraged to investigate each service on their own, as well as seek out additional vendors offering similar services.

- [American Journal Experts](#) (Discount available for Wolters Kluwer journal authors)
- [The Medical Editor](#)
- [Text Check](#)
- [Bio Science Writers](#)
- [Boston BioEdit](#)
- [ScienceDocs](#)

In addition, Annals of Plastic Surgery adheres to the SAMPL guidelines for statistical information. A link to the SAMPL guidelines may be found at <http://www.equator-network.org/wp-content/uploads/2013/03/SAMPL-Guidelines-3-13-13.pdf>

Each of the following should be submitted as a separate document within the submission file:

Cover letter: The cover letter should state the authors' intent to submit the article to Annals of Plastic Surgery, state the title of the article and authors' names, and contain any other information pertinent to the submission of the manuscript.

Title page: Include on the title page (a) complete manuscript title and a brief title for use as a running head; (b) authors' full names, highest academic degrees, and affiliations (limit of two); (c) name and address for correspondence, including fax number, telephone number, and e-mail address; (d) address for reprints if different from that of corresponding author; and (e) sources of support that require acknowledgment.

The title page must also include disclosure of funding received for this work from any of the following organizations: National Institutes of Health (NIH); Wellcome Trust; Howard Hughes Medical Institute (HHMI); RCUK; and other(s).

Structured or unstructured abstract and key words: Limit the abstract to 350 words. It must be factual and comprehensive. Limit the use of abbreviations and acronyms, and avoid general statements (eg, "the significance of the results is discussed"). The abstract should summarize the problem presented, studies undertaken, results, and conclusions; it replaces a summary at the end of the article.

Text: Provide succinct internal headings to clarify the paper's organization. Cite all tables and illustrations in the text. Define abbreviations at first mention in text and in each table and figure.

If a brand name is cited, supply the manufacturer's name and address (city and state/country). Acknowledge all forms of support, including pharmaceutical and industry support, in an Acknowledgments paragraph.

Abbreviations: For a list of standard abbreviations, consult the Council of Biology Editors Style Guide (available from the Council of Science Editors, 9650 Rockville Pike, Bethesda, MD 20814) or other standard sources. Write out the full term for each abbreviation at its first use unless it is a standard unit of measure.

References: The authors are responsible for the accuracy of the references. Key the references (double-spaced) at the end of the manuscript. Cite the references in text in the order of appearance. Cite unpublished data, such as papers submitted but not yet accepted for publication or personal communications, in parentheses in the text. If there are more than three authors, name only the first three authors and then use et al. Refer to the List of Journals Indexed in *Index Medicus* for abbreviations of journal names, or access the list at <http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/lji.html>. Sample references are given below:

Journal article

1. Lin S-D, Tsai C-C, Lai C-S, et al. Endoscope-assisted parotidectomy for benign parotid tumors. *Ann Plast Surg* 2000;45:269-273

Book chapter

2. Todd VR. Visual information analysis: frame of reference for visual perception. In: Kramer P, Hinojosa J., eds. *Frames of Reference for Pediatric Occupational Therapy*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 1999:205-256

Entire book

3. Kellman RM, Marentette LJ. *Atlas of Craniomaxillofacial Fixation*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 1999

Software

4. Epi Info [computer program]. Version 6. Atlanta: Centers for Disease Control and Prevention; 1994

Online journals

5. Friedman SA. Preeclampsia: a review of the role of prostaglandins. *Obstet Gynecol* [serial online]. January 1988;71:22-37. Available from: BRS Information Technologies, McLean, VA. Accessed December 15, 1990

Database

6. CANCERNET-PDQ [database online]. Bethesda, MD: National Cancer Institute; 1996. Updated March 29, 1996

World Wide Web

7. Gostin LO. Drug use and HIV/AIDS [*JAMA HIV/AIDS* web site]. June 1, 1996. Available at: <http://www.ama-assn.org/special/hiv/ethics>. Accessed June 26, 1997

Supplemental Digital Content

Supplemental Digital Content (SDC): Authors may submit SDC via Editorial Manager to Wolters Kluwer journals that enhance their article's text to be considered for online posting. SDC may include standard media such as text documents, graphs, audio, video, etc. On the Attach Files page of the submission process, please select Supplemental Audio, Video, or Data for your uploaded file as the Submission Item. If an article with SDC is accepted, our production staff will create a URL with the SDC file. The URL will be placed in the call-out within the article. SDC files are not copy-edited by Wolters Kluwer staff; they will be presented digitally as submitted. For a list of all available file types and detailed instructions, please visit <http://links.lww.com/A142>.

SDC Call-outs: Supplemental Digital Content must be cited consecutively in the text of the submitted manuscript. Citations should include the type of material submitted (Audio, Figure, Table, etc.), be clearly labeled as "Supplemental Digital Content," include the sequential list number, and provide a description of the supplemental content. All descriptive text should be included in the call-out as it will not appear elsewhere in the article. Example:

We performed many tests on the degrees of flexibility in the elbow (see Video, Supplemental Digital Content 1, which demonstrates elbow flexibility) and found our results inconclusive.

List of Supplemental Digital Content: A listing of Supplemental Digital Content must be submitted at the end of the manuscript file. Include the SDC number and file type of the Supplemental Digital Content. This text will be removed by our production staff and not be published.

Example:

Supplemental Digital Content 1. wmv

SDC File Requirements: All acceptable file types are permissible up to 10 MBs. For audio or video files greater than 10 MBs, authors should first query the journal office for approval. For a list of all available file types and detailed instructions, please visit <http://links.lww.com/A142>.

Digital figures:

A) Creating Digital Artwork

1. Learn about the publication requirements for Digital Artwork: <http://links.lww.com/ES/A42>
2. Create, Scan and Save your artwork and compare your final figure to the Digital Artwork Guideline Checklist (below).
3. Upload each figure to Editorial Manager in conjunction with your manuscript text and tables.

B) Digital Artwork Guideline Checklist

Here are the basics to have in place before submitting your digital artwork:

- Artwork should be saved as TIFF, EPS, or MS Office (DOC, PPT, XLS) files. High resolution PDF files are also acceptable.
- Crop out any white or black space surrounding the image.
- Diagrams, drawings, graphs, and other line art must be vector or saved at a resolution of at least 1200 dpi. If created in an MS Office program, send the native (DOC, PPT, XLS) file.
- Photographs, radiographs and other halftone images must be saved at a resolution of at least 300 dpi.
- Photographs and radiographs with text must be saved as postscript or at a resolution of at least 600 dpi.
- Each figure must be saved and submitted as a separate file. Figures should not be embedded in the manuscript text file.

Remember:

- Cite figures consecutively in your manuscript.
- Number figures in the figure legend in the order in which they are discussed.
- Upload figures consecutively to the Editorial Manager web site and enter figure numbers consecutively in the Description field when uploading the files.

Figure legends: Legends must be submitted for all figures. They should be brief and specific, and they should appear on a separate manuscript page after the references. Use scale markers in the image for electron micrographs, and indicate the type of stain used.

Color figures: The journal accepts for publication color figures that will enhance an article. Authors who submit color figures will receive an estimate of the cost for color reproduction. If they decide not to pay for color reproduction, they can request that the figures be converted to black and white at no charge.

Tables: Cite tables consecutively in the text, and number them in that order. Key each on a separate sheet, and include the table title, appropriate column heads, and explanatory legends (including definitions of any abbreviations used). Do not embed tables within the body of the manuscript. They should be self-explanatory and should supplement, rather than duplicate, the material in the text.

Style: Pattern manuscript style after the *American Medical Association Manual of Style* (10th edition). *Stedman's Medical Dictionary* (27th edition) and *Merriam Webster's Collegiate Dictionary* (11th edition) should be used as standard references. Refer to drugs and therapeutic agents by their accepted generic or chemical names, and do not abbreviate them. Use code numbers only when a generic name is not yet available. In that case, supply the chemical name and a figure giving the chemical structure of the drug. Capitalize the trade names of drugs and

place them in parentheses after the generic names. To comply with trademark law, include the name and location (city and state in USA; city and country outside USA) of the manufacturer of any drug, supply, or equipment mentioned in the manuscript. Use the metric system to express units of measure and degrees Celsius to express temperatures, and use SI units rather than conventional units.

After Acceptance

Open access

Authors of accepted peer-reviewed articles have the choice to pay a fee to allow perpetual unrestricted online access to their published article to readers globally, immediately upon publication. Authors may take advantage of the open access option at the point of acceptance to ensure that this choice has no influence on the peer review and acceptance process. These articles are subject to the journal's standard peer-review process and will be accepted or rejected based on their own merit.

The article processing charge (APC) is charged on acceptance of the article and should be paid within 30 days by the author, funding agency or institution. Payment must be processed for the article to be published open access. For a list of journals and pricing please visit our [Wolters Kluwer Open Health Journals page](#).

Authors retain copyright

Authors retain their copyright for all articles they opt to publish open access. Authors grant Wolters Kluwer an exclusive license to publish the article and the article is made available under the terms of a Creative Commons user license. Please visit our [Open Access Publication Process page](#) for more information.

Creative Commons license

Open access articles are freely available to read, download and share from the time of publication under the terms of the [Creative Commons License Attribution-NonCommercial No Derivative \(CC BY-NC-ND\) license](#). This license does not permit reuse for any commercial purposes nor does it cover the reuse or modification of individual elements of the work (such as figures, tables, etc.) in the creation of derivative works without specific permission.

Compliance with funder mandated open access policies

An author whose work is funded by an organization that mandates the use of the [Creative Commons Attribution \(CC BY\) license](#) is able to meet that requirement through the available open access license for approved funders. Information about the approved funders can be found here: <http://www.wkopenhealth.com/inst-fund.php>

FAQ for open access

<http://www.wkopenhealth.com/openaccessfaq.php>

Page proofs and corrections: Corresponding authors will receive electronic page proofs to check the copyedited and typeset article before publication. Portable document format (PDF) files of the typeset pages and support documents (eg, reprint order form) will be sent to the corresponding author by e-mail. Complete instructions will be provided with the e-mail for downloading and printing the files and for faxing the corrected page proofs to the publisher. Those authors without an e-mail address will receive traditional page proofs. It is the author's responsibility to ensure that there are no errors in the proofs. Changes that have been made to

conform to journal style will stand if they do not alter the authors' meaning. Only the most critical changes to the accuracy of the content will be made. Changes that are stylistic or are a reworking of previously accepted material will be disallowed. The publisher reserves the right to deny any changes that do not affect the accuracy of the content. Authors may be charged for alterations to the proofs beyond those required to correct errors or to answer queries. Proofs must be checked carefully and corrections faxed within 24 to 48 hours of receipt, as requested in the cover letter accompanying the page proofs.

Reprints: Authors will receive a reprint order form and a price list with the page proofs. Reprint requests should be faxed with the corrected proofs, if possible. Reprints are normally shipped 6 to 8 weeks after publication of the issue in which the item appears. Contact the Reprint Department, Lippincott Williams & Wilkins/Wolters Kluwer, 351 W. Camden Street, Baltimore, MD 21201, fax: 410-528-4434, e-mail: reprints@wolterskluwer.com with any questions.

Publisher's contact: Fax corrected page proofs, reprint order form, and any other related materials to the Production Editor, at 877-705-1375.