

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE:
GINECOLOGIA E OBSTETRÍCIA

**ANÁLISE DA VIABILIDADE DAS CÉLULAS ADIPOSAS CRIOPRESERVADAS:
PERSPECTIVAS CLÍNICAS QUANTO SUA APLICAÇÃO NA
RECONSTRUÇÃO MAMÁRIA.**

ALUNA: MÁRCIA PORTELA DE MELO

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Ginecologia e Obstetrícia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Orientadora: Profa. Dra. Ilma Simoni Brum

PORTO ALEGRE, 2019

CIP - Catalogação na Publicação

MELO, MÂRCIA PORTELA DE
ANÁLISE DA VIABILIDADE DAS CÉLULAS ADIPOSAS
CRIOPRESERVADAS: PERSPECTIVAS CLÍNICAS QUANTO SUA
APLICAÇÃO NA RECONSTRUÇÃO MAMÁRIA. / MÂRCIA PORTELA
DE MELO. -- 2019.
101 f.
Orientadora: ILMA SIMONI BRUM.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de
Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Ginecologia e
Obstetrícia, Porto Alegre, BR-RS, 2019.

1. Enxerto de gordura. 2. Reconstrução da mama. 3.
Criopreservação. 4. Tecido adiposo subcutâneo. 5.
Célula tronco-mesenquimal. I. BRUM, ILMA SIMONI,
orient. II. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

ALUNA: MÁRCIA PORTELA DE MELO

TÍTULO:

ANÁLISE DA VIABILIDADE DAS CÉLULAS ADIPOSAS CRIOPRESERVADAS:
PERSPECTIVAS CLÍNICAS QUANTO SUA APLICAÇÃO NA RECONSTRUÇÃO
MAMÁRIA.

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Ginecologia e Obstetrícia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

ORIENTADORA: Profa. Dra. Ilma Simoni Brum

APROVADA em 18 de abril de 2019

CONCEITO: A com louvor

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Ruffo Freitas Júnior (UFG)

Profa. Dra. Andréa Pires Souto Damin (UFRGS)

Dr. Prof. Marcelo Lazzaron Lamers (UFRGS)

AGRADECIMENTOS

À **minha família**, pelo constante apoio e carinho, pelos valores e fundamentos ensinados.

À **Profa. Dra. Ilma Simoni Brum**, pela sua orientação e crédito que me foram dados desde a ideia inicial da pesquisa, norteando a construção e desenvolvimento deste projeto com sua sagacidade e raciocínio brilhantes, pela paciência, pelos ensinamentos transmitidos com toda a sua experiência. Seu entusiasmo pela pesquisa e por ensinar é contagiante.

Ao **Prof. Dr. Jorge Villanova Biazús**, pelas oportunidades, pelas conversas sempre dinâmicas sobre a cirurgia da mama, fazendo aflorar ideias como a deste projeto, pelo modelo de talento, idealismo e perseverança que me inspirou a seguir na especialidade da Mastologia, em especial, na cirurgia reconstrutora e reparadora da mama.

À **Dra. Gabriela dos Santos Sant'Anna**, por todo companheirismo, pela competência, dedicação e entusiasmo na estruturação das análises bioquímicas envolvidas neste projeto, vitais para sua correta execução.

Ao **Dr. Diego Mendonça Uchoa**, pela dedicação e entusiasmo com que realizou a avaliação histopatológica e pelos ensinamentos de patologia que me proporcionou.

Ao **acadêmico de Biomedicina – UFRGS, Jeferson Piaia Dalmago**, por todo apoio e dedicação ao projeto, pela precisão nos trabalhos de análises laboratoriais.

A todos os **colegas e amigos do Serviço de Mastologia - Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA)**, por ajudarem na seleção e coleta das amostras durante as cirurgias, pelo auxílio no delineamento inicial deste projeto, pelo companheirismo e amizade.

Ao Programa de Pós-Graduação – Ginecologia e Obstetrícia da FAMED - UFRGS, seus professores e funcionários, pelo aprendizado e pela atenção dispensada a cada um dos seus alunos.

Aos funcionários e pesquisadores da Unidade de Análise Moleculares e de Proteínas (UAMP) e à Unidade de Patologia Experimental (UPE) do HCPA, pelo apoio, competência, disponibilidade e espaço para a execução deste projeto.

Aos profissionais da estatística, Prof. Charles Francisco Ferreira – PPG-GO – UFRGS e do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do HCPA, pelo apoio técnico na estatística deste trabalho.

A todas as pacientes do Serviço de Mastologia do HCPA que nos ensinam lições de vida, de amor e de perseverança todos os dias.

“São muitos os métodos, mas poucos os princípios. Quem domina os princípios pode escolher com sucesso os próprios métodos. Quem tenta adotar os métodos ignorando os princípios com certeza enfrentará problemas.”

(Ralph Waldo Emerson)

“Tudo que merece existir também merece ser conhecido, pois o conhecimento é o reflexo da existência e existem tanto coisas sórdidas quanto esplêndidas.”

(Francis Bacon)

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	8
LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE TABELAS	12
RESUMO	13
ABSTRACT	15
1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO DA LITERATURA	20
2.1 ESTRATÉGIA PARA LOCALIZAR E SELECIONAR INFORMAÇÕES	21
2.2 MAPA CONCEITUAL ESQUEMÁTICO	22
2.3 REVISÃO LITERATURA	23
2.3.1 Lipoenxertia e cirurgia da mama	23
2.3.2 Tecido adiposo	31
2.3.3 Criopreservação	34
2.3.4 Técnicas para armazenamento do enxerto de gordura autólogo	39
3 JUSTIFICATIVA	44
4 HIPÓTESE DE PESQUISA	45
5 OBJETIVOS	46
5.1 PRINCIPAL	46
5.2 SECUNDÁRIOS	46
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47
6 ARTIGO – LÍNGUA INGLESA	54
7 CONCLUSÃO	77
8 CONSIDERAÇÕES FINAIS	78
9 PERSPECTIVAS	79
ANEXO 1 – TABELAS COMPLEMENTARES	80
ANEXO 2 – MATERIAL E MÉTODO – Protocolo	83
ANEXO 3 – TCLE	92
ANEXO 4 – TCUMBio	96
ANEXO 5 – FICHAS DE COLETAS DE DADOS E ANÁLISES	97

LISTA DE ABREVIATURAS

ACP: agente crioprotetor

ANOVA: Analysis of Variance (Análise de Variância)

ASCs: *adipose-derived stem cells* (células-tronco mesenquimais)

ATM: unidade de medida da pressão atmosférica (1 atm = 1 atmosfera)

CDI: carcinoma ductal invasor

CDIS: carcinoma ductal *in situ*

CEP: Comitê de Ética em Pesquisa

CLI: carcinoma lobular invasor

CTA: célula-tronco adulta

DMSO: dimetilsulfóxido

FAS: *fatty acid synthase* (ácido graxo sintetase)

FIPE: Fundo de Incentivo à Pesquisa

FVE: fração vascular estromal

G3PDH: glicerol-3-fosfato desidrogenase

HCPA: Hospital de Clínicas de Porto Alegre

HE: hematoxilina e eosina

HGF: *hepatocyte growth factor* (fator de crescimento de hepatócito)

IFATS: *International Federation for Adipose Therapeutics*

IFP – *interstitial fluid pressure* (pressão fluída intersticial)

IHQ: imunistoquímica

IHS: *Institute of Health Sciences* (Instituto de Ciências Básicas da Saúde-UFRGS)

IL: interleucinas

IMC: índice de massa corporal

IQR: *interquatile range* (intervalo interquartil)

ISCT: *International Society for Cellular Therapy*

N2 líquido: nitrogênio líquido

NAD⁺: dinucleótido de nicotinamida e adenina

NADH: nicotinamida adenina dinucleotídeo

PBS: *phosphate-buffered saline* (tampão fosfato-salino)

PPGGO: Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Ginecologia e Obstetrícia

RPM: rotações por minuto

SD: *standard deviation* (DP - desvio padrão)

TCLE: termo de consentimento livre e esclarecido

TCUM Bio: termo de compromisso para utilizar material biológico

TNF- α : *tumor necrosis factor-alpha* (Fator de necrose tumoral- alfa)

UAMP: Unidade de Análise Molecular e de Proteínas

UFG: Universidade Federal de Goiás

UFRGS: Universidade Federal do Rio Grande do Sul

UPE: Unidade de Patologia Experimental

VEGF: *vascular endothelial growth factor* (fator de crescimento vascular endotelial)

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Preparo do enxerto de gordura conforme técnica de Coleman.p. 24
- Figura 2.** Enxerto de gordura pronto para ser enxertado em microtúneis e retrogradamente - Técnica de Coleman.p. 25
- Figura 3. A.** Paciente com 16 anos, hipoplasia mamária congênita unilateral. Realizada uma sessão de lipoenxertia (volume 201cc) e mastopexia à esquerda. Pós-operatório – 3 semanas. **B.** Paciente com importante sequela funcional e estética após cirurgia conservadora e radioterapia em mama esquerda. Realizada lipoenxertia no local com recuperação da forma, volume e movimentação livre do membro superior esquerdo. a: pré-operatório; b: pós-operatório imediato; c-d: pós-operatório tardio – 1 ano.p. 29
- Figura 4. A.** IFP e o raio do capilar em estado basal. Enxerto de gordura recebe oxigênio suficiente por difusão capilar até a neoangiogênese ocorrer. **B.** O aumento do volume enxertado, provoca aumento da IFP, diminui o raio do capilar e a oxigenação do enxerto. Estudo experimental in vivo. IFP – intersticial fluid pressure.p. 31
- Figura 5.** Estrutura do tecido adiposo em amostra de enxerto de gordura criopreservada (DMSO e Trealose) – Núcleo do adipócito. HE – magnificação original x400).p. 35
- Figura 6.** Eventos físicos e crioinjúria celular durante os processos de congelamento e descongelamento. As lesões criogênicas são causadas, pelo menos em parte, pelo efeito de solução (choque osmótico) e pela formação de gelo intracelular.p. 37
- Figura 7.** Avaliação da atividade de glicerol-3-fosfato desidrogenase (G3PDH): Apresentação das amostras e valores obtidos com a curva relativa a cada experimento. (ANEXO 2).p. 88

LISTA DE FIGURAS

FIGURAS DO ARTIGO

Figura 1 (Fig.1.). Viable adipose cells stained with 0.4% trypan blue from fresh fat and cryopreserved fat graft thawed after 20 minutes (above) and after 6 months of cryopreservation (below). A – fresh fat graft; B and D – fat graft with DMSO and trehalose; C and E – fat graft with trehalose. (Original magnification x400).
.....p. 71

Figura 2 (Fig.2.). Histologic examination (HE, original magnification x100) shows a well-retained adipose tissue structure with some fragmentation in all groups, associated with minimal shrinkage in cryopreserved fat graft samples (B and C). Legend: A – Fresh fat graft; B – Cryopreserved DMSO + Trehalose; C - Cryopreserved Trehalose.p. 72

Figura 3 (Fig.3.). Evaluation of cryopreserved fat graft viability by glycerol-3-phosphate dehydrogenase activity (G3PDH). Mann-Whitney Test – p 0.324.
.....p. 73

LISTA DE TABELAS

Tabelas do ARTIGO – LÍNGUA INGLESA

Table 1. Evaluation of tissue viability comparing fresh and cryopreserved adipose tissue at 20 minutes and 6 months in liquid nitrogen (-196°C).p. 67

Table 2. Evaluation of histology score (HE) comparing fresh and cryopreserved adipose tissue at 20 minutes and 6 months in liquid nitrogen (-196°C).p. 68

Tabelas do ANEXO 1

Tabela 1. Características clínicas das pacientes.p. 80

Tabela 2. Sumário das cirurgias e eventos clínicos.p. 82

RESUMO

O enxerto de gordura autólogo ou lipoenxertia tem sido considerado um dos principais procedimentos para correção de perdas de volume, forma, projeção e sensibilidade da mama, com melhora dos resultados cosméticos após cirurgias conservadoras da mama (seguidas de radioterapia) e reconstrutoras com a utilização de implantes ou retalhos miocutâneos após mastectomia. A viabilidade do enxerto de gordura autólogo armazenado a longo prazo, a partir de um protocolo específico e apropriado de criopreservação permanece desconhecida. **Objetivo:** Avaliar a viabilidade do enxerto de gordura autóloga, obtido conforme a técnica de Coleman, após a criopreservação das células adiposas com dois diferentes esquemas de agentes crioprotetores em dois diferentes tempos de criopreservação e desenvolver um protocolo padrão de criopreservação do tecido adiposo. **Métodos:** 12 pacientes do sexo feminino, submetidas à cirurgia da mama com lipoenxertia, foram selecionadas consecutivamente para participar deste estudo de não-inferioridade, conduzido no Serviço de Mastologia e no Centro de Pesquisa Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Foram coletadas de cada paciente amostras de 30ml de gordura do abdome inferior conforme a técnica de Coleman. No grupo 1, 5ml do enxerto de gordura fresca, não criopreservado, de cada paciente serviu como grupo controle. No grupo 2, os agentes crioprotetores dimetilsulfóxido e trealose foram adicionados às amostras de 10ml do enxerto de gordura fresca das mesmas pacientes. No grupo 3, o crioprotetor trealose foi adicionado as outras amostras de 10ml do enxerto de gordura fresca destas pacientes. Os enxertos de gordura com os agentes crioprotetores (grupos 2 e 3) foram submetidos a um congelamento lento e gradual até -196°C e um aquecimento rápido. Os enxertos de gordura fresco e criopreservado, em cada grupo, foram avaliados a partir da contagem de células adipócitas viáveis com azul trypan, da análise da atividade enzimática de glicerol-3-fosfato desidrogenase e da histologia (hematoxilina e eosina). As amostras de enxerto de gordura criopreservado (grupos 2 e 3) foram testadas em dois momentos diferentes, uma vez estabilizadas em nitrogênio líquido, em torno de 20 min e após 6 meses em nitrogênio líquido. Os resultados das análises do enxerto de gordura criopreservado (grupos 2 e 3) foram comparados com os resultados do enxerto de gordura fresco (grupo 1) nos diferentes tempos de criopreservação. Os resultados obtidos foram avaliados quanto a sua distribuição de normalidade e utilizados os testes estatísticos

adequados para comparação entre os grupos. Um valor- P menor que 0.05 foi considerado estatisticamente significativo ($P < 0.05$). A contagem de células viáveis pelo azul trypan encontrada foi similar em todos os três grupos após 20 minutos e 6 meses de criopreservação (p 0.156 and p 0.410). A atividade enzimática da glicerol-3-fosfato desidrogenase manteve-se preservada após 6 meses de criopreservação (p 0.189). Histologicamente, a avaliação do tecido adiposo não teve diferença em todos os grupos. O enxerto de gordura autólogo coletado, baseado na técnica de Coleman, e criopreservado com estes dois diferentes agentes crioprotetores conservou sua viabilidade, estrutura e funcionalidade. Os resultados encorajadores justificam que mais pesquisas sejam feitas para refinar este protocolo de criopreservação e evoluir para futuros projetos de estudos in vivo.

Palavras-chave: enxerto de gordura, lipoenxertia, reconstrução da mama, criopreservação, tecido adiposo, célula-tronco adiposa.

ABSTRACT

Autologous fat grafting or lipofilling has been considered one of the main procedures for correction of breast volume, shape, projection, and sensitivity loss, with a better cosmetic outcome after breast conservative surgeries (followed by radiotherapy) and implants or myocutaneous flap reconstruction after mastectomy. The viability of long-term storage of autologous fat graft from a specific and appropriate cryopreservation protocol remains unknown. Objective: Analyze the viability of autologous fat grafts harvested with the Coleman technique after application of a protocol with two different methodologies of cryoprotective agents at different storage times and develop a standard cryopreservation protocol for adipose tissue. Methods: Twelve (12) adult female patients were enrolled consecutively in this non-inferiority study conducted at the Breast Unit and Experimental Research Center of Hospital de Clínicas de Porto Alegre. In each patient, 30ml of fat graft was harvested with the Coleman technique from the lower abdomen. In group 1, 5 ml of fresh fat grafts without cryopreservation from each patient served as a control. In group 2, 10 ml of fresh fat grafts from the same patients was mixed with cryoprotective agents dimetil sulfoxide and trehalose. In group 3, 10 ml of fresh fat grafts was mixed with trehalose. The fat grafts with cryoprotective agents underwent cryopreservation with controlled slow cooling to -196°C and fast rewarming. Fresh and cryopreserved fat graft in each group were analyzed by viable adipocyte counts with trypan blue vital staining, glycerol-3-phosphate dehydrogenase assay and histology (hematoxylin and eosin). The cryopreserved fat graft samples (groups 2 and 3) were tested at two different moments, once they became stabilized in liquid nitrogen for about 20 minutes and after 6 months. The cryopreserved fat grafts analysis results (groups 2 and 3) were compared with the fresh fat grafts results (group 1). The distributions for normality were analyzed and the appropriate statistical tests were used to analyze the difference between the groups. A P -value less than 0.05 was considered statistically significant ($P < 0.05$). Viable adipocyte counts were found similar in all groups at 20min and 6 months of cryopreservation (p 0.156 and p 0.410). The glycerol-3-phosphatase dehydrogenase activity was maintained in all groups after 6 months of cryopreservation (p 0.189). Histologically, fatty tissue assessment had no difference in all groups. The autologous fat grafts harvested based on Coleman technique and cryopreserved with these two different methodologies of cryoprotective agents maintained its viability, structure, and

functionality. The encouraging results justify that further research be carried out to refine this cryopreservation protocol and support subsequent in vivo trials.

Keywords: fat grafting, lipofilling, breast reconstruction, cryopreservation, adipose tissue, adipose stem cell.

1 INTRODUÇÃO

A cirurgia oncoplástica da mama é definida pelo uso de procedimentos que associam a cirurgia oncológica com a adequada ressecção do tumor a técnicas da cirurgia plástica e reconstrutiva⁽¹⁾. Esta abordagem da cirurgia mamária engloba diferentes técnicas, como a mamoplastia oncológica, os retalhos miocutâneos e o uso dos implantes mamários, fazendo parte do arsenal cirúrgico no tratamento e na reconstrução mamária de pacientes com câncer de mama. Dentro deste cenário, o enxerto de gordura autólogo ou lipoenxertia (termo em inglês, *lipofilling*) tem sido considerado uma opção viável para correção de perdas de volume, forma, projeção e sensibilidade da mama, com melhora dos resultados cosméticos após cirurgias conservadoras da mama (seguidas de radioterapia) e reconstrutoras com a utilização de implantes ou retalhos miocutâneos após mastectomia⁽²⁻⁷⁾.

Esta técnica consiste em um procedimento simples e menos invasivo, que pode evitar cirurgias complementares mais extensas como os retalhos miocutâneos. A transferência de gordura de uma área como o abdome para a mama com o objetivo de melhorar sua forma e volume já havia sido descrita em publicação de Illouz et al. *La Sculpture Chirurgicale par Lipoplastie*. Paris, em 1988, citada por Delay et al. em sua publicação⁽⁶⁾. De forma similar, em 1991, Fournier et al. descreveram sua técnica de aumento do volume mamário pela lipoenxertia em pacientes que não desejavam a inserção de implantes, mas apenas um moderado aumento de volume das mamas⁽⁸⁾. Embora esta técnica não seja nova, seu uso mais amplo na cirurgia reconstrutora da mama foi introduzido recentemente^(5,9).

O interesse pela lipoenxertia foi reavivado, no início dos anos 90, após a publicação de estudos conduzidos por Coleman, os quais confirmaram a possibilidade da realização da transferência do enxerto autólogo de gordura, seguindo um protocolo específico de lipoaspiração, preparo e injeção do enxerto de gordura^(2,3). Várias pesquisas vêm sendo desenvolvidas e publicadas sobre a técnica de lipoenxertia na mama, avaliando eficácia e tolerância, assim como, comprovando a sua segurança clínica e radiológica^(6,7,9-12).

A lipoenxertia permite a restauração do contorno e do volume da mama de uma forma que nenhuma outra técnica demonstrou, em virtude da versatilidade e da consistência natural da mama conferida pelo enxerto de gordura, sendo uma cirurgia com menor morbidade do que as cirurgias reconstrutoras com implantes ou retalhos,

quando bem indicada⁽⁶⁾. No entanto, um dos maiores obstáculos em obter resultados favoráveis a longo prazo é a taxa variável e imprevisível de absorção do enxerto no local, a qual pode variar de 30% a 50% do volume injetado em algumas séries de casos^(6,9,10,11). A elevada taxa de absorção frequentemente leva à necessidade da realização de uma hipercorreção na área lipoenxertada ou de procedimentos cirúrgicos repetidos nas áreas doadora e receptora, podendo gerar dificuldade em obter um resultado considerado ótimo, insatisfação da paciente, maior número de procedimentos em bloco cirúrgico com aumento de custos e morbidade, além de traumatismos repetidos na área doadora, o que provoca uma progressiva maior dificuldade de obtenção do enxerto de gordura pela fibrose cicatricial reacional. A hipercorreção, mencionada anteriormente, para compensar a taxa de absorção do lipoenxerto, quando exagerada, ocasiona compressão de vasos capilares, redução da perfusão vascular e menor difusão de oxigênio local, importantes para a sobrevivência do enxerto, favorecendo também o surgimento de áreas de necrose gordurosa^(6,9,10,11).

Problema de Pesquisa: Até o momento, o enxerto de gordura autólogo lipoaspirado apenas pode ser injetado imediatamente, durante o mesmo procedimento. O excedente do tecido adiposo coletado precisa ser descartado ou a lipoaspiração interrompida, mesmo com área doadora viável, porque foi atingido o limite a ser lipoenxertado na área receptora. Em virtude deste fato, existe um grande interesse em desenvolver técnicas para o adequado armazenamento e preservação do enxerto de gordura a longo prazo, permitindo realizar procedimentos futuros sem a necessidade de novas lipoaspirações, reduzindo tempo cirúrgico, morbidade e novos traumatismos na área doadora, que podem dificultar a lipoaspiração em procedimentos futuros. Além disso, sem a necessidade de nova lipoaspiração, muitos casos de lipoenxertia poderão ser realizados sob anestesia local, a nível ambulatorial, principalmente quando são necessários procedimentos adicionais para correções de defeitos menores, após a primeira lipoenxertia. Rietjens et al., em estudo sobre reconstrução mamária com lipoenxertia, descrevem casos de procedimentos realizados sob anestesia local, quando o volume de gordura enxertado necessário ficou em torno de 50cc⁽⁹⁾. Os procedimentos duraram em torno de 1h e as pacientes receberam alta 2h após o final do procedimento⁽⁹⁾.

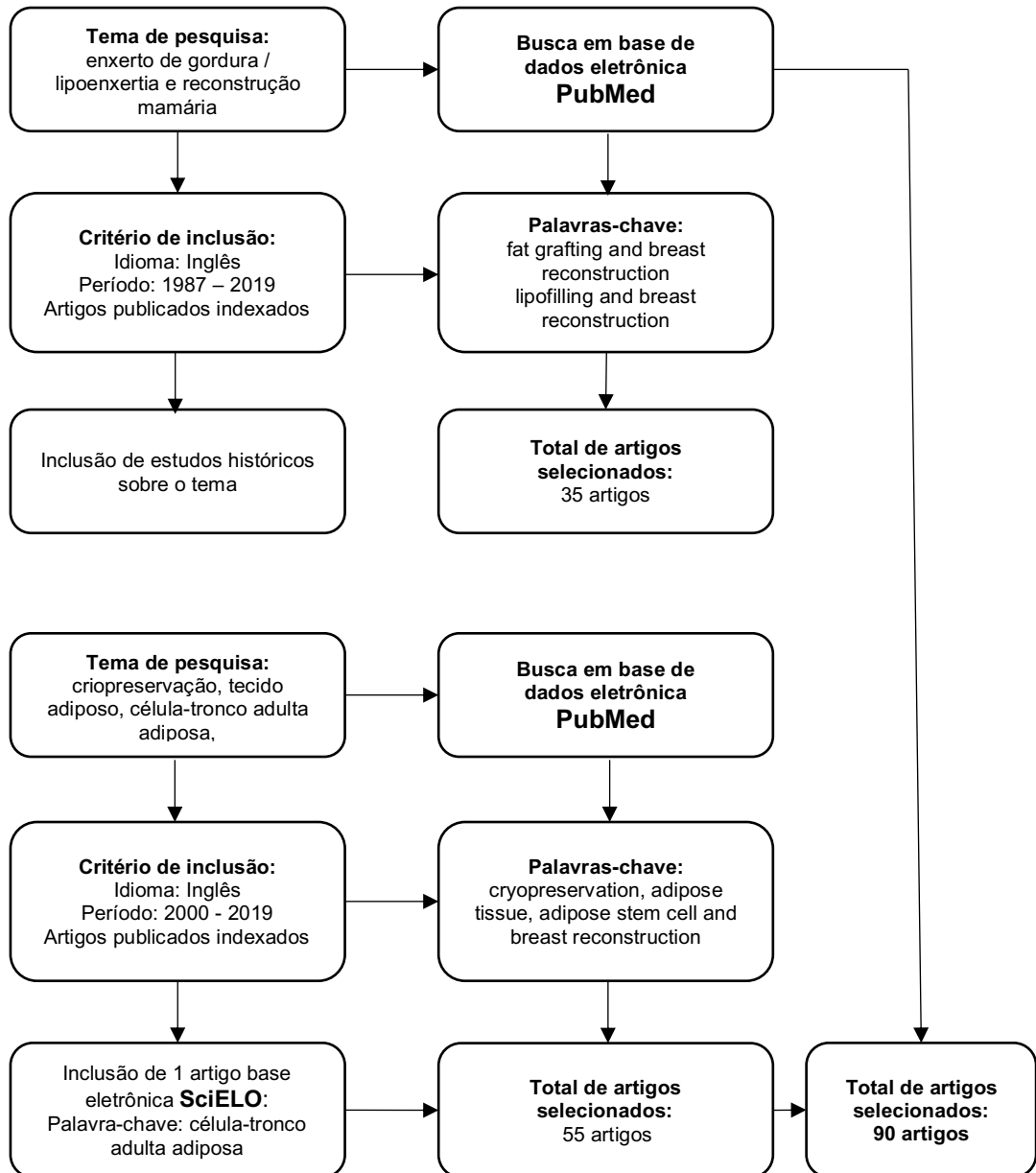
As pesquisas sobre criopreservação do tecido adiposo têm levado a algumas descobertas importantes, que podem ter impacto benéfico sobre os procedimentos

envolvendo o enxerto de gordura autólogo^(12,13). A criopreservação do tecido adiposo com agentes crioprotetores (ACP) adequados, somado a protocolos de congelamento e descongelamento específicos, parece manter a estrutura normal e função fisiológica ótima do tecido adiposo⁽¹⁴⁾. Além disso, o tecido adiposo tem se mostrado uma fonte potencial de células-tronco adultas (CTA) para uso na terapia celular ou na engenharia tecidual⁽¹⁵⁾. No entanto, a viabilidade e o tempo de armazenamento do enxerto de gordura autólogo, assim como, o estabelecimento de uma técnica ideal de criopreservação permanecem em discussão⁽¹²⁻¹⁶⁾.

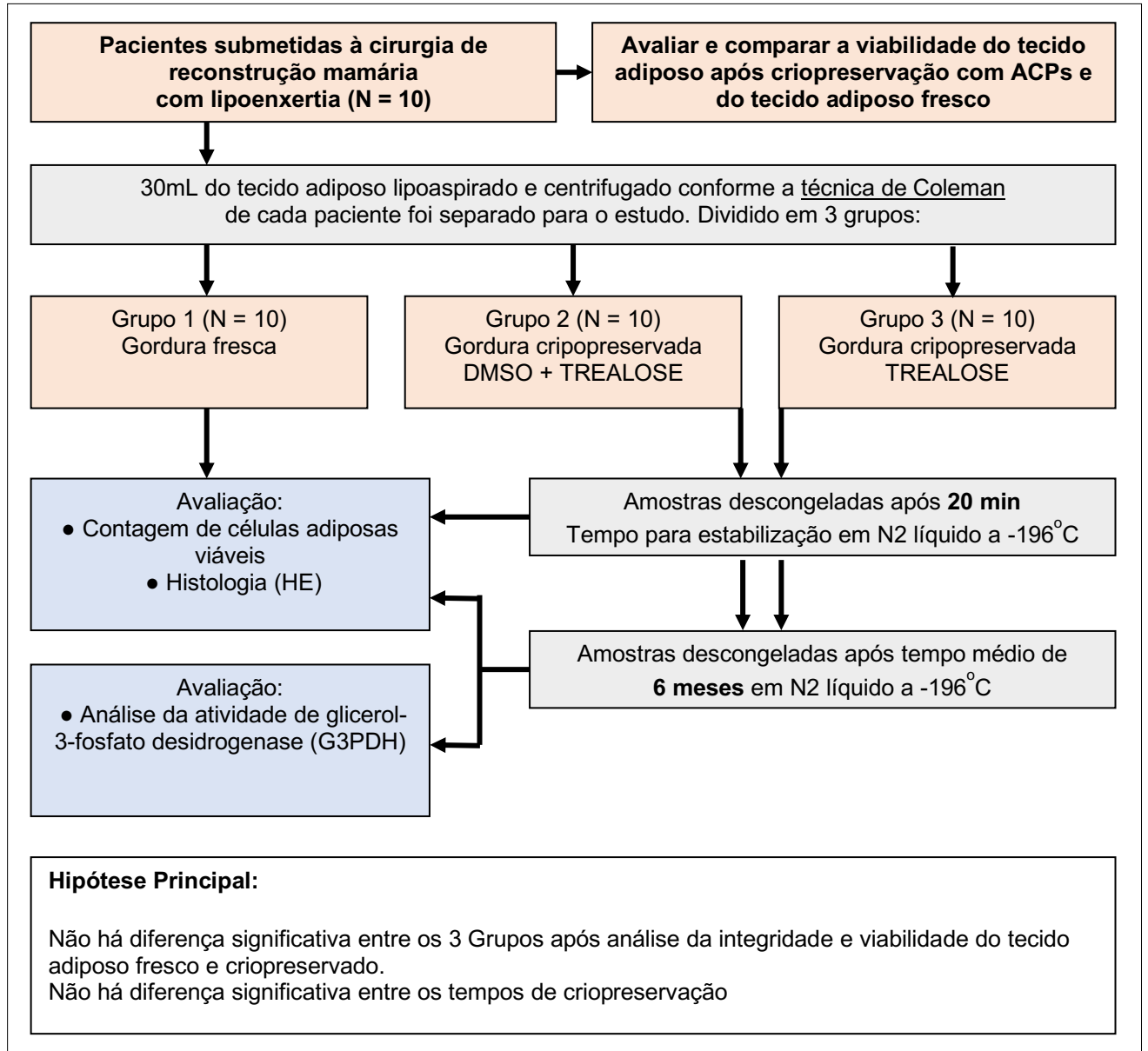
2 REVISÃO DA LITERATURA

Foram selecionados 90 artigos indexados, publicados em inglês, relacionados aos conceitos e conhecimentos relevantes para evolução do projeto de pesquisa e desenvolvimento da base teórica, a fim de responder à questão principal da pesquisa: avaliar a viabilidade do tecido adiposo criopreservado e desenvolver um protocolo de criopreservação do enxerto de gordura eficaz para manter a integridade das células adiposas em longo prazo. A revisão foi realizada na base de dados eletrônica da *National Library of Medicine* (PubMed) por meio das palavras-chaves *fat grafting and breast reconstruction, lipofilling and breast reconstruction*, referente ao período de 1987 a 2017, incluindo estudos históricos no tema. A revisão também foi feita com as palavras-chave *cryopreservation, adipose tissue, adipose stem cell*, referente ao período de 2000 a 2017. Foi incluído um artigo identificado na biblioteca virtual SciELO referente ao tema células-tronco adiposas (definição e perspectivas clínicas).

2.1 ESTRATÉGIA DE BUSCA BIBLIOGRÁFICA



2.2 MAPA CONCEITUAL ESQUEMÁTICO



2.3 REVISÃO DA LITERATURA

2.3.1 Lipoenxertia e cirurgia da mama

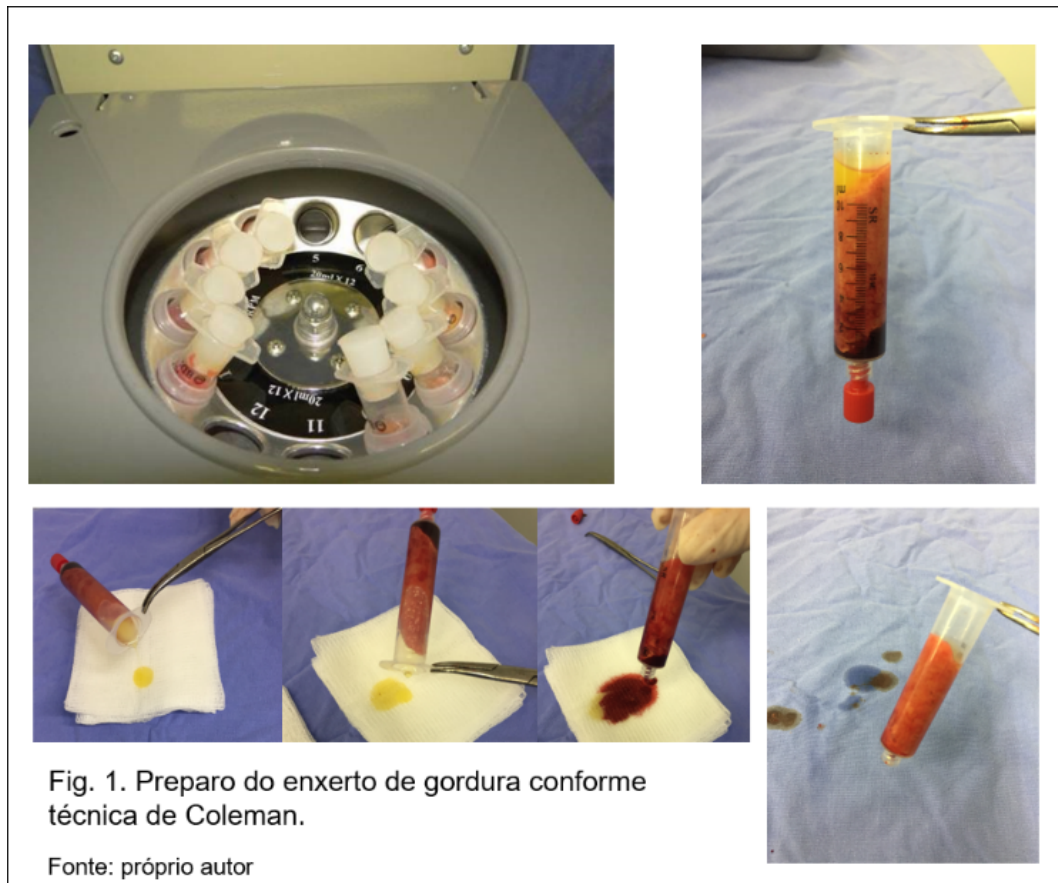
A primeira publicação sobre o uso do enxerto de gordura autólogo (lipoenxertia) foi apresentada por Gustav Neuber no 22º Congresso da Sociedade de Cirurgia Alemã em 1893⁽²⁰⁾. Nos anos 1980s, Illouz e Fournier desenvolveram uma das primeiras abordagens para transferência do enxerto de gordura através do uso de seringas, chamada de “microlipoinjeção”^(8,21,22).

A lipoenxertia apresentou um desenvolvimento exponencial a partir da descrição da técnica por Sydney Coleman^(2,3,4), com crescente aplicação, na última década, em cirurgias reconstrutoras da mama, incluindo pacientes com histórico prévio de câncer de mama e cirurgias conservadoras^(5,6,9,112). Coleman, em sua técnica, realiza uma sucção com pressão moderada com a finalidade de minimizar o dano aos adipócitos através de uma seringa de 20ml conectada, diretamente, a uma cânula de lipoaspiração de 2,5mm a 3mm. O material obtido é centrifugado a 3000 rpm, durante 3 minutos, permitindo a separação das frações oleosa (porção superior – decantada), hemática (porção inferior) e gordurosa (central) (Figura 1). A fração gordurosa é, então, injetada por incisões praticamente puntiformes, na área receptora, através de cânulas de 1,4mm a 1,8mm, de forma a criar microtúneis em diferentes direções, evitando a formação de lagos de gordura e, assim, reduzindo a ocorrência de cistos oleosos e necrose gordurosa. Cada microtúnel de gordura está rodeado por tecido local vascularizado, indispensável para a sobrevivência do enxerto (Figura 2). A gordura é injetada sob baixa pressão, enquanto, simultaneamente, a cânula é retirada, prevenindo a injeção de gordura intravascular^(2,3).

Estudos experimentais comprovam a atividade endócrina, parácrina e autócrina do tecido adiposo transplantado e explicam a capacidade do enxerto de gordura estimular a angiogênese, em áreas com lesões pós-radioterapia, devido à presença de elevada concentração de células progenitoras no tecido adiposo⁽²³⁻²⁶⁾. Esta capacidade levou a vários questionamentos iniciais sobre a segurança oncológica da lipoenxertia na mama a partir de estudos pré-clínicos, trazendo inicialmente restrições a sua aplicação em cirurgias mamárias⁽⁷⁾. Contudo uma série

de estudos clínicos publicados envolvendo a técnica de lipoenxertia na cirurgia da mama, incluindo pacientes tratadas por carcinoma de mama, alguns com seguimento por mais de 10 anos, demonstraram a segurança oncológica da técnica^(5,6,9,11,25,27-29).

Figura 1. Preparo do enxerto de gordura conforme técnica de Coleman.



Fonte: próprio autor

Figura 2. Enxerto de gordura pronto para ser enxertado em microtúneis e retrogradamente - Técnica de Coleman.



Fonte: próprio autor

Discussões em torno da lipoenxertia também surgiram após duas publicações por Bircoll et al.^(30,31), as quais provocaram questionamentos quanto a sua aplicação em cirurgias da mama devido a possíveis alterações nos exames de imagem para seguimento das mamas após cirurgia^(32,33,34). Os opositores a sua prática enfatizavam que as injeções de gordura, no tecido mamário, poderiam gerar a formação de microcalcificações e cistos, dificultando a detecção do câncer de mama. Bircoll et al., em resposta, observaram que as calcificações, após a transferência do enxerto de gordura, diferem das calcificações suspeitas para neoplasia maligna, quanto a sua aparência radiológica; salientando o fato de que estas calcificações também podem ser geradas por outras cirurgias na mama, como a mamoplastia redutora^(35,36). De fato, um estudo retrospectivo sobre mamografias, as quais foram realizadas após mamoplastia redutora, relatou a ocorrência de microcalcificações em 50% dos casos dois anos após a cirurgia⁽³⁷⁾. Este estudo ressalta que, na maioria dos casos, é

possível diferenciar estas calcificações daquelas observadas no câncer de mama, sendo confirmado por outros autores^(38,39,40). Em estudo mais recente, não houve diferença significativa no número de biópsias percutâneas por alteração em exames de imagem (p 0,14) entre pacientes submetidas à reconstrução mamária associada à lipoenxertia e pacientes do grupo controle que não realizaram lipoenxertia, ao longo de um período de seguimento de 4 anos⁽⁴¹⁾.

Assim, a lipoenxertia não interfere na acurácia dos exames de imagem da mama, quando realizada seguindo protocolos visando obter um enxerto de qualidade, com o maior número de adipócitos viáveis, menor quantidade de detritos, observando o volume adequado a ser injetado no local para evitar a formação de lagos de gordura, comprometendo a sua vascularização. Além disso, o seguimento das pacientes com auxílio de imagens com qualidade e avaliadas por radiologista especializado em imagem da mama, permite a diferenciação entre achados benignos e suspeitos para neoplasia maligna^(6,41).

Outro importante desfecho estudado por Rigotti et al., no tratamento com lipoenxertia, quando realizada em pacientes com cirurgias conservadoras da mama ou mastectomias seguidas de radioterapia, é a significativa melhora clínica cosmética e funcional⁽²⁶⁾. Após a radioterapia complementar, no tratamento do câncer de mama, muitas pacientes apresentam alterações isquêmicas crônicas como radiodermites, atrofia e retrações do subcutâneo e áreas de radionecrose, associadas a limitações funcionais e dor local. Esta melhora clínica é associada à presença, no enxerto de gordura lipoaspirado, de células-tronco mesenquimais com potencial para estimular revascularização (neoangiogênese) de tecidos isquêmicos por mecanismos mediados pela liberação de fatores de crescimento angiogênicos e anti-apoptóticos^(26,42). A lipoenxertia permite resgatar estes casos, nos quais comumente a radioterapia limita as possibilidades de reconstrução mamária e aumenta o risco de complicações associadas, sem aumentar a morbidade para as pacientes.

Rietjens et al. publicaram série de 155 pacientes submetidas à lipoenxertia para correção de sequelas decorrentes de cirurgias conservadoras (quadrantectomias) e radioterapia para tratamento do câncer de mama entre 2005 e 2008⁽⁹⁾. Embora alguns estudos tenham considerado um aumento hipotético do risco de recidiva local, decorrente da capacidade das células adipócitas e pré-adipócitas de estimular a angiogênese e o crescimento celular^(24,25), tal fato não tem sido observado nos estudos clínicos conduzidos até o momento. Rietjens et al. detectaram apenas

uma recidiva local, após um tempo médio de seguimento de mais de 18 meses, não descartando a hipótese de que a mesma, em decorrência do surgimento precoce, possivelmente, já estivesse presente antes da lipoenxertia, contudo, ainda não diagnosticada pelos exames de imagem prévios⁽⁹⁾. Entretanto a lipoenxertia na mama deve ser realizada dentro de um protocolo com detalhado seguimento e investigação por exames de imagem da mama (mamografia, ultrassonografia e ressonância magnética, se necessária). As pacientes devem ser satisfatoriamente informadas dos riscos de recidiva local após o tratamento do câncer de mama, independente da realização da lipoenxertia^(6,9,30).

Outro estudo caso-controle conduzido por Petit et al. avaliou 321 pacientes operadas por câncer de mama, entre 1997 e 2008, sendo 89% dos casos de carcinoma invasor da mama⁽⁷⁾. Estas pacientes foram submetidas à lipoenxertia com propósito reconstrutivo e com um seguimento médio de 56 meses da primeira cirurgia e 26 meses da lipoenxertia. Não houve diferença significativa entre os grupos casos e controles (sem lipoenxertia) quanto à ocorrência de recidivas locais, independente da cirurgia inicial, mastectomia ou setorectomia (p 0,792). Quando esta análise foi limitada às pacientes com carcinoma ductal *in situ* (35 pacientes), o grupo submetido à lipoenxertia apresentou maior número de recidivas locais (3 eventos) ($p < 0.001$), embora considerando um número pequeno de casos^(7, 43). Os autores realizaram um terceiro estudo, incluindo casos de carcinoma ductal *in situ* (CDIS) e um grupo controle de pacientes não submetidas à lipoenxertia, ampliando a amostra de casos e controles. Neste estudo, a diferença, anteriormente identificada de maior risco de recidiva nos casos de CDIS com lipoenxertia, não foi mais vista. Este resultado também foi influenciado pelo maior tempo de seguimento dos grupos casos e controles, permitindo observar uma taxa de recorrências locais similares entre os grupos e dentro do esperado, conforme dados da literatura. Petit et al. concluíram que o procedimento de enxerto de gordura autólogo (lipoenxertia) é seguro para as pacientes com câncer de mama, apesar da necessidade de ampliar o tempo de seguimento^(11,43).

Em outro estudo, 719 pacientes com carcinoma de mama submetidas à mastectomia ou cirurgia conservadora de mama associadas a técnicas de reconstrução com lipoenxertia e 670 pacientes no grupo controle sem lipoenxertia foram acompanhadas por 5 anos. As pacientes foram avaliadas para o desfecho de recorrência locoregional (tempo de seguimento após a lipoenxertia ficou em torno de

3 a 4 anos). A taxa de recorrência locorregional cumulativa em 5 anos foi de 1,6% e 4,1% para casos e controles, respectivamente (p 0,455). A recorrência sistêmica ocorreu em 2,4% dos casos e 3,6% dos controles (p 0,514). Estes resultados corroboram com o resultado de outros estudos sobre a segurança oncológica da lipoenxertia na reconstrução mamária⁽²⁹⁾. Neste mesmo estudo, foram seguidas 305 pacientes sem diagnóstico de carcinoma de mama, submetidas a cirurgias estéticas ou reconstrutoras associadas à lipoenxertia por malformações congênitas ou adquiridas e mastectomizadas com reconstrução associada à lipoenxertia por mutação BRCA1/BRCA2 (33 pacientes). Após 4 anos de seguimento, nenhum caso de carcinoma de mama foi registrado nestas pacientes⁽²⁹⁾.

Uma das maiores experiências com a técnica de lipoenxertia na mama constitui a apresentada por Delay et al. em 2009 (880 casos com seguimento de 10 anos)⁽⁶⁾, onde o enxerto de gordura coletado de acordo com a técnica de Coleman (1995)⁽²⁾, é aplicado em cirurgias estéticas da mama (30 casos), na correção de deformidades e sequelas decorrentes da cirurgia conservadora por câncer de mama (setorectomia seguida de radioterapia) e na reconstrução mamária pós-mastectomia (734 casos), assim como, na correção de deformidades congênitas da mama (106 casos)⁽⁶⁾. Após 10 anos de seguimento, não foi descrito nenhum caso de recidiva local nas pacientes com cirurgia prévia por câncer de mama, que realizaram lipoenxertia posterior^(6,27). Nestas séries, também foi demonstrada a aplicação da técnica nas malformações torácicas, como mamas tuberosas, assimetria mamária, *pectus excavatum* e síndrome de Poland, representando um importante incremento nos resultados cosméticos obtidos⁽²⁷⁾ (Figura 3).

Figura 3. A. Paciente com 16 anos, hipoplasia mamária congênita unilateral. Realizada uma sessão de lipoenxertia (volume 201cc) e mastopexia à esquerda. Pós-operatório – 3 semanas. **B.** Paciente com importante sequela funcional e estética após cirurgia conservadora e radioterapia em mama esquerda. Realizada lipoenxertia no local com recuperação da forma, volume e movimentação livre do membro superior esquerdo. a: pré-operatório; b: pós-operatório imediato; c-d: pós-operatório tardio – 1 ano.

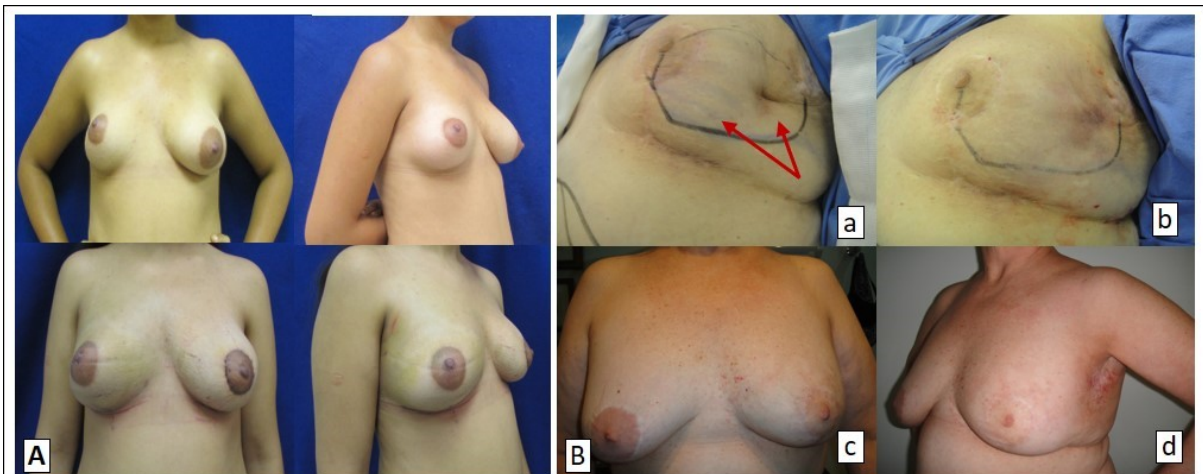


Fig. 3. A. Paciente com 16 anos, hipoplasia mamária congênita unilateral. Realizada uma sessão de lipoenxertia (volume - 201cc) e mastopexia à esquerda. Pós-operatório – 3 semanas. **B.** Paciente com importante sequela funcional e estética após cirurgia conservadora e radioterapia em mama esquerda. Realizada lipoenxertia no local com recuperação da forma, volume e movimentação livre do membro superior esquerdo. **a:** pré-operatório; **b:** pós-operatório imediato; **c-d:** pós-operatório tardio – 1 ano.

Fonte: própria autora – paciente Hospital de Clínicas de Porto Alegre

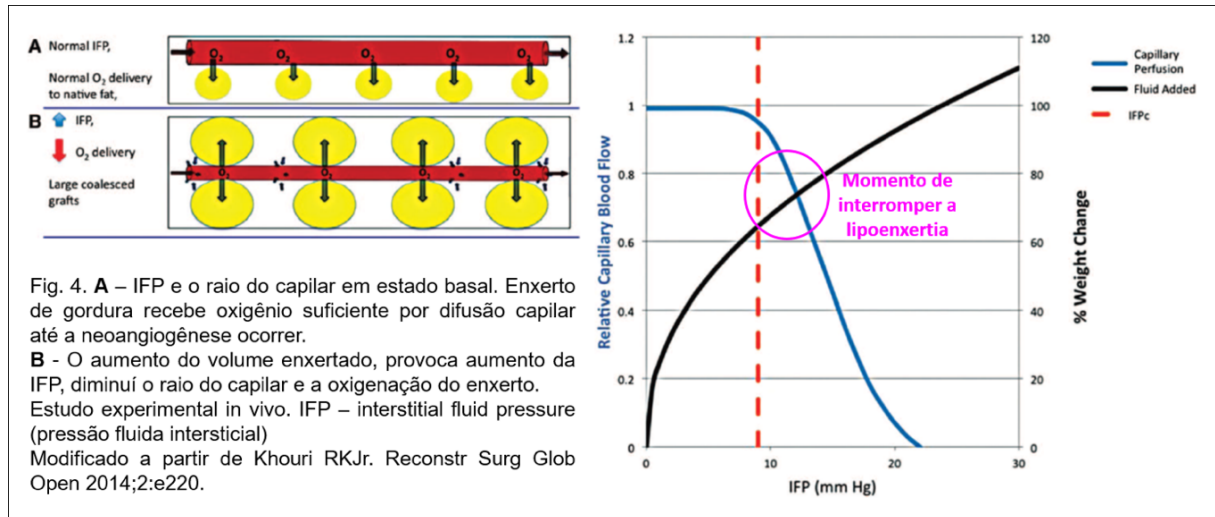
Fonte: Próprio autor

Apesar dos resultados favoráveis em relação ao uso do enxerto de gordura autólogo, sua versatilidade, disponibilidade e biocompatibilidade, os resultados cirúrgicos dependem de alguns fatores principais: a técnica cirúrgica, a qualidade da área doadora e as características da área receptora^(2,4,9). A técnica de Coleman caracterizada pelo preparo do enxerto de gordura através da centrifugação com eliminação do componente oleoso do conteúdo aspirado, parece reduzir a formação de calcificações, quando comparada a outras técnicas de lipoenxertia, reduzindo a ocorrência de imagens da mama anormais após o procedimento⁽⁹⁾. O desenvolvimento de necrose adiposa focal, após 3 a 4 meses de seguimento, é extremamente operador dependente e, em algumas casuísticas, ocorre em 15% dos 50 primeiros casos de um cirurgião, ficando estável em 3%, após obter maior experiência com a técnica⁽⁶⁾. Rietjens et al. enfatizam que a incidência de complicações está relacionada a curva de aprendizado da técnica, sendo em torno de

3,6%⁽⁹⁾. Algumas outras séries relatam taxas de complicações variando entre 0 a 5%^(6, 44,45,46).

Outro fator importante para obter resultados mais favoráveis a longo prazo é a taxa imprecisa de absorção do enxerto, que pode atingir até 50%^(2,4,9,47) e nos leva de volta ao Problema de Pesquisa. Na tentativa de compensar a variável absorção do enxerto, sem prejuízo ao resultado final, evitando novos procedimentos de lipoaspiração, é realizada uma hipercorreção na área receptora com a lipoenxertia de um volume maior que o estimado para aquele local, prevendo que parte será absorvido. No entanto o enxerto de gordura depende da obtenção de oxigênio por difusão pela parede dos capilares até ocorrer a neovascularização. Um grande volume enxertado pode levar a compressão dos capilares e uma perfusão vascular insuficiente, aumentando o risco de áreas de necrose extensas, com perda do enxerto e danos à área receptora, que podem dificultar futuras lipoenxertias⁽⁴⁷⁾ (Figura 4). Desta forma, a possibilidade de armazenar em longo prazo a gordura excedente lipoaspirada pode representar um ganho significativo para a cirurgia reconstrutora e reparadora da mama, gerando grande interesse em estudar e entender as características da célula e do tecido adiposo, suas potencialidades e os instrumentos necessários para seu armazenamento.

Figura 4. A. IFP e o raio do capilar em estado basal. Enxerto de gordura recebe oxigênio suficiente por difusão capilar até a neoangiogênese ocorrer. **B.** O aumento do volume enxertado, provoca aumento da IFP, diminui o raio do capilar e a oxigenação do enxerto. Estudo experimental in vivo. IFP – interstitial fluid pressure (pressão fluída intersticial).



Fonte: Modificado a partir de Khouri RKJr. Reconstr Surg Glob Open 2014;2:e220.

2.3.2 Tecido adiposo

As células adiposas derivam de células tronco-mesenquimais pluripotentes chamadas *adipose-derived stem cells* (ASCs), traduzida como células-tronco derivadas de adipócitos. As ASCs podem tanto se proliferar, quanto se diferenciarem em adipócitos. Neste processo, a adipogênese (regulada por fatores de crescimento, hormônios e citocinas) apresenta uma fase inicial de pré-adipócitos e uma segunda fase, onde o pré-adipócito adquire as características do adipócito maduro, com acúmulo de lipídios no citosol, levando o núcleo do centro para a periferia da célula. Nesta fase, podem ser detectados marcadores de diferenciação celular como as enzimas glicerol-3-fosfato desidrogenase (G3PDH) e ácido graxo sintetase (fatty acid synthase – FAS)⁽⁴⁸⁾.

Os adipócitos maduros sintetizam proteínas envolvidas no metabolismo lipídico e esteroide. A leptina é uma destas proteínas e apresenta um papel importante na regulação do balanço energético, estando com níveis elevados na obesidade. Também está envolvida no aumento da permeabilidade vascular no tecido adiposo e,

assim, influenciando a densidade microvascular⁽⁴⁹⁾. Fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucinas (IL) -6 e -8 são proteínas pró-inflamatórias também sintetizadas pelos adipócitos em maior volume na obesidade e exercem um papel de resistência à insulina e à lipólise⁽⁵⁰⁾. O tecido adiposo branco consiste em adipócitos maduros, fibroblastos, macrófagos, linfócitos, as células contidas na fração vascular estromal (FVE), vasos sanguíneos, nervos e linfonodos^(42,47,51). A FVE contém ASCs, pré-adipócitos, células endoteliais, pericitos, macrófagos e fibroblastos. O fenótipo das ASCs, na FVE, foi descrito através de uma declaração conjunta da *International Federation for Adipose Therapeutics* (IFATS) e a *International Society for Cellular Therapy* (ISCT) em 2013 como CD34+CD45-CD31-CD273a-CD73+CD13+⁽⁵¹⁾. A localização exata desta população de células-tronco tem sido sugerida como perivascular⁽⁵²⁾.

O tecido adiposo é altamente vascularizado e os adipócitos parecem estar posicionados muito próximos de capilares sanguíneos, possibilitando trocas eficientes de produtos metabólicos. Como o tecido adiposo se apresenta em contínua expansão e regressão ao longo da vida, esta rede de vasos capilares acompanha sua evolução. As ASCs podem liberar fatores de crescimento relacionados à angiogênese como o fator de crescimento vascular endotelial (Vascular Endothelial Growth Factor - VEGF) e o fator de crescimento de hepatócito (Hepatocyte Growth Factor - HGF)⁽⁵³⁾. Por outro lado, as células endoteliais preservam a viabilidade, proliferação e aderência de pré-adipócitos, quando estes encontram-se submetidos a condições de hipóxia⁽⁵⁴⁾.

Uma importante vantagem do tecido adiposo é que ele pode ser obtido com alguma facilidade a partir do subcutâneo por procedimentos pouco invasivos de lipoaspiração. O tecido adiposo contém um grande número de células-tronco mesenquimais, quando comparado a medula óssea. Em um transplante de medula óssea pode-se obter aproximadamente 6×10^6 células nucleadas por mL⁽⁵⁵⁾ das quais apenas 0,001% a 0,01% são células-tronco⁽⁵⁶⁾. Em comparação, o lipoaspirado do subcutâneo contém aproximadamente $0,5-2,0 \times 10^6$ células por grama de tecido adiposo^(55, 57), onde a porcentagem de células-tronco varia de 1 a 10%^(57,58). Esta característica do tecido adiposo, gerou o início de uma série de experimentos sobre o potencial da ASCs para a cirurgia reconstrutiva e reparadora. As células da FVE podem ser isoladas do lipoaspirado por digestão enzimática ou por alguns protocolos mecânicos. Estas células são mais resistentes à manipulação que os adipócitos maduros, quando realizada a passagem seriada por microcânulas. Em meio ao grupo

heterogêneo de células que formam a FVE, é importante salientar que as ASCs podem ser isoladas através da aderência à camada plástica de superfícies de cultivo⁽⁵⁷⁾. As ASCs derivadas do estroma do tecido adiposo apresentam potencial para se diferenciarem em células de tecidos mesodérmicos, como o próprio tecido adiposo, cartilaginoso, ósseo e muscular esquelético e não mesodérmicos, como os hepatócitos, as células pancreáticas endócrinas, os neurônios e as células endoteliais vasculares^(42,59).

Vários estudos defendem a importância de cânulas de maior diâmetro (3mm ou mais) e lipoaspirar com baixa pressão para a manutenção de uma boa viabilidade das células adiposas (a lipoaspiração com seringa exerce uma pressão negativa em média de -0,6 atm)^(20,57,60). Células adiposas viáveis podem ser obtidas das regiões do abdome, flancos, coxas e face medial dos joelhos, mas parece haver uma maior concentração de ASCs no enxerto de gordura obtido a partir da região abdominal e face interna das coxas⁽⁶⁰⁾. Porém o mais importante é lidar com o enxerto de gordura da forma mais gentil possível, removendo o máximo de óleo e de componentes hemáticos presentes^(4,9,27). Além de usar cânulas de calibres entre 1 – 2 mm para realizar a lipoenxertia, conforme a área receptora, como descrito anteriormente, evitando a formação de lagos de gordura^(2,3,4).

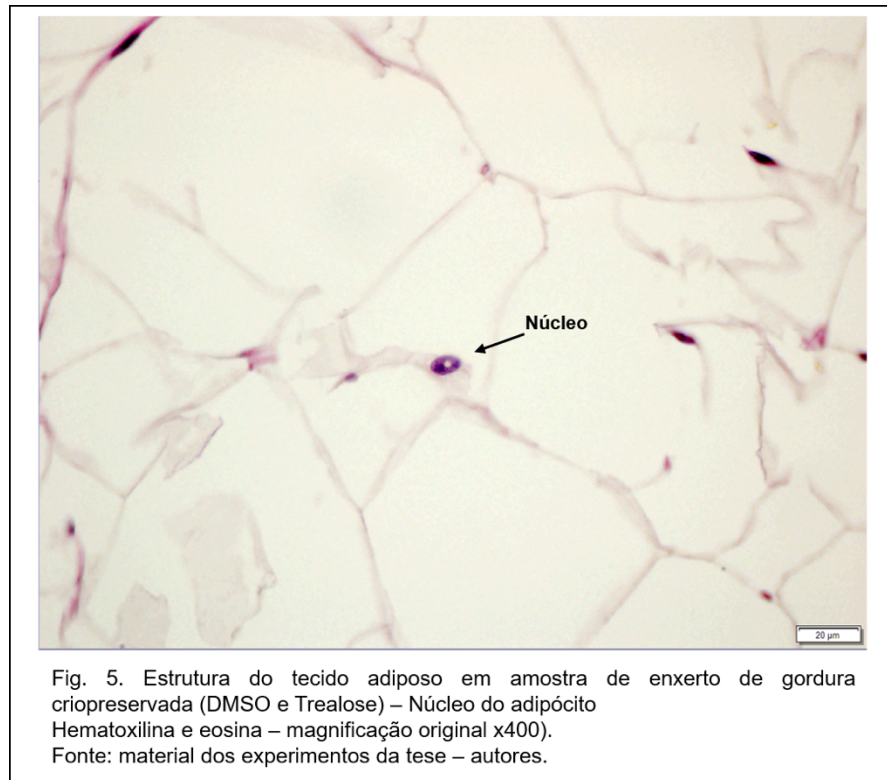
Existem duas teorias sobre o papel das diferentes células que formam o enxerto de gordura após lipoenxertadas na área receptora. A “teoria de sobrevivência do enxerto” (*graft survival theory*)^(57,61), na qual o enxerto sobrevive por difusão de oxigênio a partir dos capilares locais até que ocorra uma neovascularização na área receptora⁽⁶²⁾. A segunda teoria, chamada “teoria de reposição do enxerto” (*graft replacement theory*), desenvolvida por Eto et al.⁽⁶³⁾ a partir de estudo *in vivo*, defende a existência de três zonas da periferia ao centro do enxerto, formadas por uma área de sobrevivência do enxerto (adipócitos sobreviventes), outra área de regeneração (adipócitos mortos, ASCs sobreviventes) e uma área necrótica central (adipócitos e ASCs mortos)⁽⁶³⁾, concluindo que poucos adipócitos sobrevivem aos processos de lipoaspiração e lipoenxertia, sendo substituídos pela diferenciação das ASCs presentes no próprio enxerto. Também é possível uma fusão das duas teorias, envolvendo estímulo parácrino do enxerto sobre as ASCs da área receptora e uma atividade angiogênica local⁽⁵⁷⁾. O interesse em relação ao enxerto de gordura autólogo cresce quanto sua aplicação na cirurgia reconstrutiva e na engenharia celular a partir

das ASCs, assim como, nas pesquisas frente à possibilidade de manter a viabilidade destas células após a criopreservação do material lipoaspirado^(13,15,16,64).

2.3.3 Criopreservação

A criopreservação é um processo que envolve baixas temperaturas como forma de reduzir o metabolismo celular, permitindo que as células ou os tecidos sejam conservados por períodos indeterminados, permitindo a retomada do desenvolvimento celular normal após período armazenadas^(65,66) em nitrogênio líquido (-196 °C). O uso de agentes crioprotetores (ACPs) são fundamentais para crioproteção celular e tecidual durante a redução da temperatura⁽⁶⁶⁾ (Figura 5). Os sistemas de nitrogênio líquido (N2 líquido) permitem o armazenamento a temperaturas totalmente constantes, enquanto o freezer mecânico está sujeito a variações de temperatura capazes de comprometer a qualidade das amostras estocadas^(67,68).

Figura 5. Estrutura do tecido adiposo em amostra de enxerto de gordura criopreservada (DMSO e Trealose) – Núcleo do adipócito.
HE – magnificação original x400



Fonte: material dos experimentos da tese – autores.

A temperatura em que é realizada a criopreservação é conhecida como “temperatura criogênica”, temperatura extremamente baixa, na qual os gases encontram-se liquefeitos à pressão atmosférica^(66,69). Essa temperatura é obtida com o nitrogênio líquido, cuja temperatura é de -196 °C, ou em sua fase de vapor, na qual a temperatura varia em função da distância entre a amostra e o nível de nitrogênio líquido⁽⁶⁷⁾. Na temperatura criogênica, todas as reações químicas, processos biológicos, bem como as atividades intra e extracelulares estão suspensas, portanto, teoricamente, uma célula ou tecido podem ser mantidos criopreservados indefinidamente^(65,66). Porém, para isso, é necessária a utilização de um ACP na composição da solução de criopreservação, cuja concentração depende do método de criopreservação empregado.

A criopreservação baseia-se em cinco etapas fundamentais:

1) exposição ao ACP, com a finalidade de permitir a difusão desses agentes nos compartimentos celulares;

2) resfriamento com redução da temperatura de forma gradual (congelamento lento) ou súbita (vitrificação), na qual a amostra passa da temperatura ambiente para a temperatura criogênica;

3) armazenamento ou estocagem, permitindo a preservação do material em temperatura ultrabaixa por períodos indefinidos;

4) descongelamento ou aquecimento, etapa na qual ocorre o resgate do material criopreservado e retomada do metabolismo celular; e

5) diluição ou remoção do ACP, a fim de evitar, na presença de temperatura fisiológica ou ambiente, a produção de metabólitos secundários, o que intensificaria a ação tóxica destes aditivos. O DMSO, mesmo quando usado em baixas concentrações, deve ser removido através de uma série de diluições com solução salina e centrifugação em temperatura ambiente^(12,69).

O processo de congelamento na criopreservação pode ser realizado por dois métodos: congelamento lento e vitrificação.

A congelamento lento é caracterizada por uma redução gradual da temperatura, com o objetivo de reduzir o estresse térmico na fase de transição das soluções do estado líquido para o estado sólido^(12,69). Além disso, é caracterizada por uma desidratação celular gradual que evita ou reduz a formação de cristais de gelo⁽⁷⁰⁾. Nesta situação, baixas concentrações de ACP são suficientes a fim de que esses objetivos sejam alcançados^(66,71). Para o resfriamento lento, o material biológico geralmente é congelado sob o controle de um freezer programável e, uma vez atingido uma adequada desidratação celular, a qual ocorre quando a temperatura se encontra entre -30 a -80 °C, o material é estocado em nitrogênio líquido à temperatura de -196 °C^(12,64).

A vitrificação consiste na redução da temperatura de forma brusca, cujo objetivo é a obtenção de um sólido amorfo ou em estado vítreo, que difere do sólido cristalino por não haver formação de cristais de gelo no interior dos compartimentos celulares⁽⁷⁴⁾. Contudo, para a obtenção desse estado vítreo é necessário, além de uma alta taxa de resfriamento, a utilização de uma solução com alta viscosidade, que pode ser obtida com o emprego de elevadas concentrações de ACPs. A vitrificação destina-se a amostras de pequenos volumes (1-2µL), sendo outra limitação para seu uso no enxerto de gordura a potencial contaminação com agentes patogênicos⁽⁶⁶⁾.

Em geral, todas as potenciais lesões celulares, no material criopreservado, ocorrem durante os processos de congelamento e descongelamento^(64,65). A lesão

celular no resfriamento rápido é atribuída à formação de gelo intracelular, enquanto o resfriamento lento causa alterações osmóticas devido aos efeitos da exposição a soluções intra e extracelulares altamente concentradas ou pelas interações mecânicas entre as células e o gelo extracelular (Figura 6)⁽⁶⁶⁾.

Figura 6. Eventos físicos e crioinjúria celular durante os processos de congelamento e descongelamento. As lesões criogênicas são causadas, pelo menos em parte, pelo efeito de solução (choque osmótico) e pela formação de gelo intracelular (quebra das estruturas intracelulares).

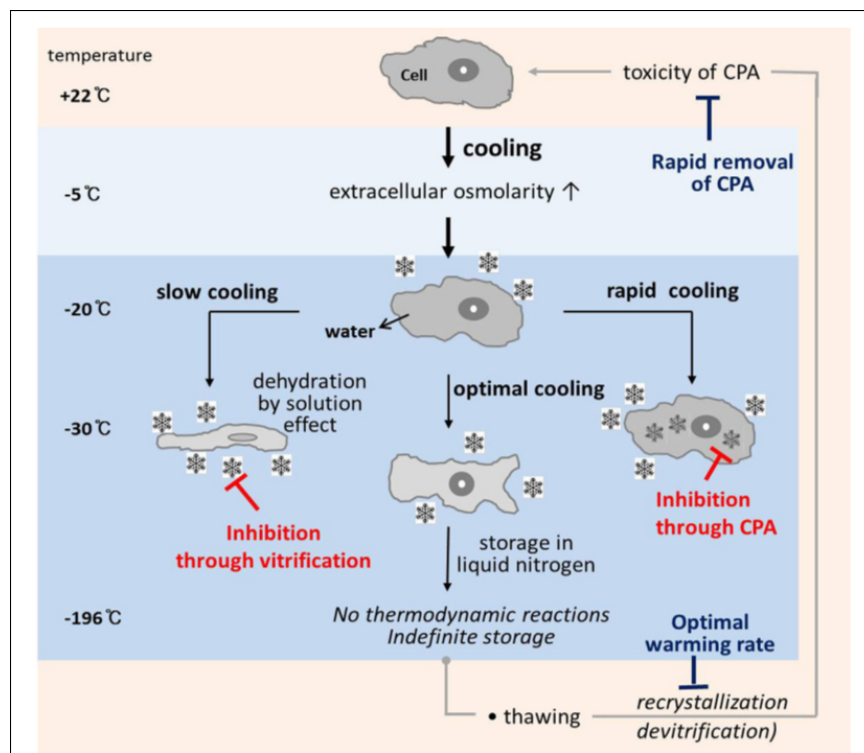


Fig. 6 – Eventos físicos e crioinjúria celular durante os processos de congelamento e descongelamento. As lesões criogênicas são causadas, pelo menos em parte, pelo efeito de solução (choque osmótico) e pela formação de gelo intracelular (quebra das estruturas intracelulares). CPA, cryoprotective agent (agente crioprotetor).

Fonte: TH Jang et al. Clinical uses of cryopreservation. 2017.

Fonte: TH Jang et al. Clinical uses of cryopreservation. 2017.

Independente do método empregado, a adição de um ACP representa um fator chave para o sucesso da criobiologia, sendo indispensável sua presença para que as células possam resistir às injúrias resultantes do procedimento de criopreservação^(12,64,66,71). Contudo, os metabólitos resultantes da degradação dos ACPs pela célula podem ser tóxicos para as células, sendo este um fator limitante para o sucesso da utilização dos mesmos^(71,72,73).

Os ACPs agem protegendo a célula durante o período de estocagem em baixas temperaturas, prevenindo a formação de gelo intracelular e possíveis danos causados pela desidratação. Dependendo do local de ação, os ACPs podem ser classificados como intracelulares ou extracelulares^(71,73).

Os agentes crioprotetores intracelulares são solventes orgânicos de baixo peso molecular que possuem a capacidade de penetrar na célula^(67,72,73). Dentre os crioprotetores intracelulares destacam-se, o etilenoglicol, o dimetilsulfóxido (DMSO) e o propanodiol por apresentarem uma capacidade de penetração superior ao glicerol e menor toxicidade. Contudo, a eficiência destes ACPs pode variar em função da estrutura (célula ou tecido) a ser criopreservada^(66,71,72), do tipo e concentração e tempo de exposição utilizado antes do processo de criopreservação propriamente dito.

De forma geral os ACPs intracelulares atuam substituindo parcialmente a água no interior da célula e ligam-se ao hidrogênio das moléculas de água intracelular^(71,72,74), aumentando a viscosidade da solução de congelação, conseqüentemente, reduzindo o ponto de congelação da mesma e a formação de gelo intracelular. Além disso, os ACPs também agem prevenindo a exposição do material a altas concentrações de eletrólitos, através da ligação aos próprios eletrólitos ou pela substituição parcial pela água, prevenindo a ocorrência de shrinkage (“encolhimento”) celular durante a desidratação.

Os ACPs não permeáveis, como a trealose, reduzem a quantidade de água antes do congelamento, estabilizando e mantendo a integridade da membrana celular e das proteínas durante o congelamento e descongelamento. A trealose, um dissacarídeo, por não apresentar toxicidade tecidual, não necessita ser removida após o descongelamento. Ainda há muito a ser estudado sobre a trealose^(12,13,61,70,72,74,75,76).

Pu LL e Cui X et al. demonstraram, em estudos sucessivos, que o congelamento lento com uma redução constante da temperatura do tecido adiposo (1-2°C/minuto) até -30°C, deixando o tecido em repouso, nesta temperatura, por 10min e a seguir o transferindo para o nitrogênio líquido a -196°C, associado posteriormente

ao rápido descongelamento, parece ser o melhor método para criopreservar o enxerto de gordura^(12,64,70,75).

2.3.4 Técnicas para armazenamento do enxerto de gordura autólogo

Na busca de identificar a técnica eficaz para armazenar a longo prazo o enxerto de gordura, alguns estudos iniciais foram conduzidos a partir do simples congelamento do tecido adiposo lipoaspirado em N2 líquido^(77,78). Estudo conduzido com coleta do enxerto de gordura a partir de ratos albinos da linhagem Swiss, armazenado em N2 líquido a -35°C por 6 meses, injetado posteriormente no escapo destes ratos, na sequência avaliado por meio da histologia (coloração HE) e teste colorimétrico enzimático para avaliação da atividade mitocondrial, identificou que a viabilidade e histologia do enxerto de gordura foram similares ao do enxerto fresco⁽⁷⁷⁾. Em outro estudo, o tecido adiposo obtido a partir de casos de abdominoplastia foi congelado em N2 líquido a -195,8°C e, assim como no estudo anterior, demonstrou conservar a atividade metabólica mitocondrial por 8 dias⁽⁷⁸⁾.

Contudo estes resultados têm sido questionados por outros pesquisadores, os quais identificaram que a adição de um ACP, antes de congelar o enxerto de gordura, pode proporcionar processos de congelamento e descongelamento mais controlados, aumentando a viabilidade do enxerto^(17,79). Em um destes estudos, o enxerto de gordura coletado, conforme a técnica de Coleman, foi congelado em N2 líquido a -20°C e -80°C por 30 dias, apresentando maior número de células viáveis a -80°C. No entanto, houve uma perda de 92,7% de sua atividade metabólica e a adição de ACP levou a preservação de mais de 54% da atividade basal medida pela atividade mitocondrial⁽¹⁶⁾.

Estes resultados são corroborados por outro estudo que também comparou o enxerto de gordura obtido por lipoaspiração fresco e criopreservado sem e com a adição de ACPs (DMSO e trealose), armazenado em N2 líquido a temperatura de -196°C. Significativamente, um maior número de adipócitos viáveis e melhor função celular foi observada nas amostras criopreservadas com ACPs, embora ainda inferior aos resultados do tecido fresco⁽¹⁵⁾. O uso dos ACPs (DMSO e trealose) resultou em uma maior contagem de células adiposas viáveis no grupo criopreservado com ACP,

quando comparado ao grupo criopreservado sem ACP (2.15 ± 0.68 vs $1.04 \pm 0.35 \times 10^6/\text{ml}$, $p < 0,0001$), porém, ainda significativamente menor comparado ao enxerto de gordura fresco ($p < 0,05$). Não houve diferença quanto a função celular avaliada através da atividade da enzima glicerol-3-fosfato desidrogenase (G3PDH) entre os grupos gordura criopreservada com ACPs e gordura fresca, mas a função celular foi significativamente melhor em relação ao grupo criopreservado sem ACPs ($p < 0,01$)⁽¹⁵⁾.

Os mesmos autores avaliaram a partir do estudo acima *in vitro* a manutenção do enxerto de gordura 16 semanas após sua injeção *in vivo* no escalpo de camundongos nude, comparando o volume, peso e histologia (colocação HE) dos enxertos fresco, criopreservado sem ACPs e criopreservado com o esquema anteriormente descrito de ACP (DMSO e trealose)⁽⁸⁰⁾. Após 16 semanas, o enxerto de gordura encapsulado foi removido cirurgicamente e avaliado. Houve maior manutenção do volume, peso e estrutura arquitetural do tecido adiposo no enxerto de gordura criopreservado com os ACP, mas os resultados ainda foram inferiores em relação ao enxerto fresco, como por exemplo no volume retido [$47,7\% \pm 18,6\%$ no enxerto fresco comparado a $35,3\% \pm 7,8\%$ no enxerto com ACP ($p < 0,05$) e $6,5\% \pm 3,7\%$ no enxerto sem ACP ($p < 0,0001$)]. Entretanto foi possível observar uma significativa maior preservação do volume após a criopreservação com os ACPs, conforme protocolo descrito anteriormente^(15,80) em relação ao enxerto sem ACP ($p < 0,0001$)⁽⁸⁰⁾. O mesmo estudo *in vivo* foi reproduzido com avaliação do enxerto de gordura após 4 meses, demonstrando resultados semelhantes. O enxerto de gordura com ACPs conservou melhor o volume e peso em relação ao enxerto sem ACPs ($p < 0,0001$), mas ainda um pouco menor em relação ao enxerto fresco após 4 meses de seguimento⁽⁸¹⁾.

Baseado nos estudos anteriores, Pu LL et al. repetiram os processos *in vitro*, comparando o enxerto de gordura criopreservado (DMSO + Trealose) com o enxerto de gordura fresca, contudo padronizando a forma de coleta por lipoaspiração do enxerto de gordura conforme a técnica descrita por Coleman⁽⁶⁴⁾. A contagem de células adiposas viáveis foi similar em ambos os grupos ($3,46 \pm 0,91$ vs. $4,12 \pm 1,11 \times 10^6/\text{mL}$, $p = 0,22$), mas a avaliação da manutenção da funcionalidade celular medida pela atividade da enzima G3PDH foi significativamente menor no grupo criopreservado ($0,47 \pm 0,09$ vs. $0,66 \pm 0,09$ u/mL, $p < 0,001$), mesmo com o uso dos

ACPs. Em relação a histologia, apesar da fragmentação das amostras pela forma de coleta, não houve diferença da arquitetura tecidual entre os grupos⁽⁶⁴⁾.

Nos estudos anteriores, o DMSO, um dos ACPs mais aplicados nos procedimentos de criopreservação de células e tecidos, foi usado em uma concentração (3,3%) bem menor que aquela usada em relatos anteriores (10%-20%)⁽¹⁵⁾. Como o DMSO pode ser tóxico para células e tecidos, a baixa concentração usada pode reduzir este efeito adverso do ACP para as células adiposas após o descongelamento⁽⁸²⁾. O mesmo grupo de investigadores identificou que ao adicionar trealose, outro ACP, os resultados da avaliação final após a criopreservação foram melhores. Estes resultados foram compatíveis com os achados em estudo anterior de criopreservação da pele fetal com a combinação dos ACPs trealose e DMSO⁽⁷²⁾.

A formação de gelo intracelular é considerada o primeiro mecanismo pelo qual o dano celular pode ocorrer, podendo ser prevenida pela ação dos ACPs. Um ACP permeável, como DMSO, protege a célula do dano pelo congelamento por reduzir a formação de gelo dentro e fora da célula^(15,65). Entretanto, um ACP não-permeável, como a trealose, pode promover a proteção de diferentes formas. Ela desidrata as células e desta forma reduz a quantidade de água intracelular antes do congelamento. Isto também estabiliza a membrana celular e proteínas durante o congelamento e descongelamento⁽⁷²⁾. Claramente, a combinação destes dois tipos de ACPs (DMSO e trealose) poderia teoricamente aumentar a proteção à célula durante a criopreservação. Esta pode vir a ser considerada uma técnica padrão para o estudo da criopreservação a longo prazo do tecido adiposo lipoaspirado⁽¹⁵⁾. Este benefício é provavelmente resultado de um efeito sinérgico da trealose^(70,72)

O processo de criopreservação não parece alterar significativamente a arquitetura do tecido adiposo. É possível que isto seja reflexo do adipócito preenchido por lipídios, contendo menor volume de água intracelular, apresentando menos variação de volume quando congelada⁽¹⁵⁾. Apesar disso, os estudos também enfatizam a importância do enxerto de gordura ser submetido a um processo de congelamento lento e controlado (-1°C/minuto) até -30°C, sendo então transferido e armazenado em N₂ líquido a -196°C^(17,65,79). O descongelamento rápido para a temperatura de 37°C também é preconizado como método ideal, seguido da remoção do ACP, dependendo do tipo de agente usado^(65,79).

É importante salientar que mesmo quando usado em baixas concentrações (3,3%), o DMSO ainda precisa ser removido do tecido adiposo após o

descongelamento através de uma série diluições em solução salina e centrifugações em temperatura ambiente, antes deste tecido poder ser aplicado *in vivo*^(15,84). Por outro lado, a trealose, um ACP não-permeável, é basicamente um açúcar, não tóxica para os tecidos, não sendo necessário sua remoção antes do tecido criopreservado ser administrado *in vivo*⁽⁸⁵⁾. A trealose também tem sido usada isoladamente como um ACP na criopreservação de hemácias e espermatozoides com resultados promissores^(86,87,88).

Assim, considerando estudos anteriores, onde foi observado que DMSO combinado à trealose resultou em uma melhora da viabilidade de células e tecidos após a criopreservação, investigadores analisaram a possibilidade da trealose ser usada como ACP isolado, sendo capaz de proteger o tecido adiposo após sua criopreservação. O tecido adiposo lipoaspirado foi criopreservado de duas formas, sem uso de ACPs e com adição de trealose 0,25M, posteriormente comparado ao tecido fresco. Foi observado um maior número de células viáveis e melhor função celular no tecido criopreservado com trealose, mas estes resultados ainda foram menores quando comparados ao tecido fresco. A criopreservação não pareceu alterar a arquitetura do tecido adiposo, contudo graus variáveis de *shrinkage* (termo em inglês, sem tradução específica para o português significando “encolhimento da célula”) foi encontrado nos tecidos criopreservados, sendo maior quando não foi usado nenhum ACP, não tendo sido observada presença de degeneração adiposa ou necrose nas amostras, indicando a possibilidade de investir na trealose como ACP isolado para o armazenamento a longo prazo do tecido adiposo⁽⁸⁵⁾.

Algum tempo depois, Cui et al. testaram *in vitro* a trealose em sete diferentes concentrações (0,20; 0,25; 0,30; 0,35; 0,40; 0,50 e 0,75 mol/L) com objetivo de identificar a concentração ótima, que também levaria a manutenção da viabilidade do enxerto de gordura após sua criopreservação, quando comparado ao enxerto fresco⁽⁷⁵⁾. Foi observado um número maior de células adiposas viáveis quando usada a trealose na concentração de 0,35 mol/L, não havendo diferença com o grupo controle (gordura fresca) em relação a contagem de células viáveis ($1,88 \pm 0,61$ vs. $2,4 \pm 0,52 \times 10^6/\text{ml}$; $p > 0,05$). Na análise da função celular através da atividade de G3PDH, também não houve diferença significativa com o grupo controle ($0,35 \pm 0,08$ U/mL). Apesar disto, parece que a atividade de G3PDH foi discretamente maior, quando a concentração de trealose foi $> 0,35$ mol/L, mas esta tendência não atingiu significância estatística ($p > 0,05$). Assim como, foi mantida a histologia sem

diferenças arquiteturais entre os grupos, embora tenha sido evidenciado um leve *shrinkage* dos adipócitos em algumas amostras criopreservadas⁽⁷⁵⁾. A trealose, quando usada isoladamente na concentração de 0,35M, pode promover adequada proteção ao tecido adiposo durante o processo de criopreservação, eliminando os efeitos citotóxicos do DMSO após o descongelamento. Além disso, não seriam necessárias diluições adicionais e centrifugações para remoção do DMSO do enxerto de gordura criopreservado, evitando mais danos adicionais a este tecido⁽⁷⁵⁾.

Na segunda parte deste estudo, um experimento *in vivo* foi conduzido com injeção subcutânea em ratos de 0,5ml de enxerto de gordura criopreservado com DMSO + trealose, outro contendo apenas trealose 0,35M e outro de gordura fresca (controle). Após 8 semanas, foi realizada a avaliação do volume, peso e histologia do enxerto. A histologia baseada na arquitetura do tecido adiposo foi mantida nos três grupos. Os grupos com DMSO + trealose e apenas com trealose não diferiram entre si para os desfechos volume ($38,2 \pm 10,1\%$ vs. $46,1 \pm 14,4\%$, ns) e peso ($34.1 \pm 12.1\%$ versus $38.9 \pm 14.7\%$, ns), mas tiveram resultados inferiores em relação ao grupo com gordura fresca ($p < 0,05$) após 8 semanas de seguimento⁽⁷⁶⁾.

Ainda são necessários muitos estudos até chegarmos no protocolo adequado e mais viável para a criopreservação do tecido adiposo lipoaspirado. A maioria destes estudos demonstra que o uso de ACPs faz diferença para obter resultados mais próximos ao tecido adiposo fresco. O desenvolvimento de protocolos de criopreservação poderá gerar a base para a criação de bancos de gordura autóloga para uso futuro em procedimentos de reconstrução através da lipoenxertia^(18,64,89) e, até mesmo, em diferentes terapias com o uso de células-tronco⁽⁸⁹⁾. O sucesso do armazenamento a longo prazo das células adiposas lipoaspiradas poderá representar um avanço na cirurgia reconstrutora, em especial, da mama^(15,64,76,85,90).

3 JUSTIFICATIVA

O uso do enxerto de gordura autóloga para a reconstrução mamária representa uma das maiores evoluções nesta área. Apresenta crescente aplicação como técnica isolada ou associada a outros procedimentos de reconstrução com importante melhora nos resultados não apenas estéticos, mas também funcionais, em especial, para as pacientes com histórico prévio de carcinoma de mama ou malformações mamárias. Contudo um dos maiores obstáculos na obtenção de resultados favoráveis é a taxa variável de absorção no local enxertado, a qual pode chegar a 30% - 50% do volume total enxertado^(6,9,64). Essa taxa de absorção elevada e imprevisível leva à necessidade da realização de hipercorreções e, em muitos casos, a realização de múltiplos procedimentos no local da reconstrução, associados a um maior desconforto para a paciente, surgimento de áreas de necrose na área receptora, aumento da morbidade, aumento de custos e traumas repetidos na área doadora.

A existência de um limite de gordura que pode ser enxertado em cada procedimento, conforme a área e o tipo de reconstrução proposta, além do fato desta gordura ser coletada e enxertada durante o mesmo procedimento cirúrgico, obrigam que o excesso de tecido adiposo lipoaspirado seja descartado ou o procedimento de lipoaspiração interrompido, mesmo que a paciente ainda tenha uma área doadora com volume e qualidade satisfatória. Desta forma, há um grande interesse em pesquisar uma técnica eficaz para a preservação a longo prazo do enxerto de gordura para uso futuro, possibilitando novas reconstruções, correções de sequelas cirúrgicas e pós-radioterapia, maior segurança e satisfação para a paciente, além da redução do tempo cirúrgico dos procedimentos e dos traumatismos na área doadora.

É necessário o desenvolvimento de protocolos eficazes e economicamente acessíveis para criopreservação do enxerto de gordura, possibilitando a perspectiva futura de criação de um Banco de Gordura para uso na reconstrução mamária, podendo estender seu benefício para outras áreas de pesquisa e aplicação clínica.

4 HIPÓTESE DE PESQUISA

As características avaliadas referentes à viabilidade do tecido adiposo fresco e após a sua criopreservação não apresentam diferenças significativas, sendo possível desenvolver um protocolo de criopreservação eficaz para manter a integridade das células adiposas para uso posterior.

5 OBJETIVOS

5.1 PRINCIPAL

Comparar a viabilidade, estrutura e funcionalidade do enxerto de gordura, obtido conforme a técnica de Coleman, fresco e após sua criopreservação com duas diferentes metodologias de agentes crioprotetores.

5.2 SECUNDÁRIOS

Avaliar a viabilidade, estrutura e funcionalidade do enxerto de gordura entre diferentes tempos de criopreservação.

Mensurar e definir a atividade intracelular da enzima glicerol-3-fosfato desidrogenase no tecido adiposo criopreservado após 6 meses, segundo o protocolo executado.

Padronizar um protocolo de criopreservação do tecido adiposo viável para desenvolvimento e aplicação clínica futura.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Clough KB, Kaufman GJ, Nos C, et al. Improving breast cancer surgery: a classification and quadrant per quadrant atlas for oncoplastic surgery. *Ann Surg Oncol* 2010;17:1375-1391.
2. Coleman SR. Long-term survival of fat transplants: controlled demonstrations. *Aesthetic Plast Surg* 1995;19:421–425.
3. Coleman SR. Facial recontouring with lipostructure. *Clin Plast Surg* 1997;24:347-367.
4. Coleman SR. Structural fat grafting: More than a permanent filler. *Plast Reconstr Surg* 2006;118:108-20.
5. Coleman SR, Saboeiro AP. Fat grafting to the breast revisited: safety and efficacy. *Plast Reconstr Surg* 2007;119:775-785.
6. Delay E, Garson S, Tousson G, Sinna R. Fat Injection to the Breast: Technique, Results, and Indications Based on 880 Procedures Over 10 years. *Aesthet Surg J* 2009;29(5):360-376.
7. Petit JY, Botteri E, Lohsiriwat V, et al. Locoregional recurrence risk after lipofilling in breast cancer patients. *Annals of Oncology* 2012;23:582-588.
8. Fournier PF. Facial recontouring with fat grafting. *Dermatol Clin* 1990;8:523–37.
9. Rietjens M, De Lorenzi F, Rossetto F, et al. Safety of fat grafting in secondary breast reconstruction after câncer. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 2011;64:477-484.
10. Biazús JV, Falcão CC, Parizotto AC, et al. Immediate Reconstruction with Autologous fat Transfer Following Breast-Conserving Surgery. *Breast Journal* 2015;21(3):268-75.
11. Petit JY, Maisonneuve P, Rotmensz N, et al. Safety of Lipofilling in Patients with Breast Cancer. *Clin Plastic Surg* 2015;42:339–344.
12. Biazus JV, Stumpf CC, Melo MP, et al. Breast-Conserving Surgery with Immediate Autologous Fat Grafting Reconstruction: Oncologic Outcomes. *Aesthetic Plast Surg*. 2018;42(5):1195-1201.
13. Billings EJr, May JJr. Historical review and present status of free fat graft autotransplantation in plastic and reconstructive surgery. *Plast Reconstr Surg* 1989;83:368-381.

14. Kaufmann 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;119:323-331.
15. Pu LL, Cui X, Fink BF, et al. Long-term preservation of adipose aspirates after conventional lipoplasty. *Aesthet Surg J* 2004;24:536-541.
16. Wolter TP, Heimburg DV, Stoffels I, et al. Cryopreservation of mature human adipocytes: in vivo measurement of viability. *Ann Plast Surg* 2005;55:408-413.
17. Moscatello DK, Dougherty M, Narins RS, et al. Cryopreservation of human fat for soft tissue augmentation: viability requires use of cryoprotectant and controlled freezing and storage. *Dermatol Surg* 2005;31:1506-1510.
18. Pu LL, Cui X, Fink BF, Dayong G, Vasconez HC. Adipose aspirates as a source for human processed lipoaspirate cells after optimal cryopreservation. *Plast Reconstr Surg* 2006;117:1845-50.
19. Pu LL, Cui X, Fink BF, et al. The fate of cryopreserved adipose aspirates after in vivo transplantation. *Aesthet Surg J* 2006;26:653-661.
20. Sommer B, Sattler G. Current Concepts of Fat Graft Survival: Histology of Aspirated Adipose Tissue and Review of the Literature. *Dermatol Surg* 2000;26:1159–1166.
21. Illouz YG. The fat cell graft. A new technique to fill depressions. *Plast Reconstr Surg* 1986;78:122.
22. Fournier PF. Fat grafting: my technique. *Dermatol Surg*. 2000;26(12):1117-28.
23. Park J, Euhus DM, Scherer PE. Paracrine and Endocrine Effects of Adipose Tissue on Cancer Development and Progression. *EndocrineReviews* 2011;32:550–570.
24. Martin-Padura I, Gregato G, Marighetti P, et al. The White Adipose Tissue Used in Lipotransfer Procedures Is a Rich Reservoir of CD34⁺ Progenitors Able to Promote Cancer Progression. *Cancer Res* 2012;72(1):325-34.
25. Lohsiriwat V, Curigliano G, Rietjens M. Autologous fat transplantation in patients with breast cancer: “silencing” or “fueling” cancer recurrence? *The Breast* 2011;20:351-357.
26. Rigotti G, Marchi A, Galiè M, et al. Clinical treatment of radiotherapy tissue damage by lipoaspirate transplant: a healing process mediated by adipose-derived adult stem cells. *Plast Reconstr Surg* 2007;119:1409-1422.
27. Delay E, Guerid S. The Role of Fat Grafting in Breast Reconstruction. *Clin Plastic Surg* 2015;42:315–323.

28. Cohen O, Lan G, Karp N, Choi M. Determining the Oncologic Safety of Autologous Fat Grafting as a Reconstructive Modality: An Institutional Review of Breast Cancer Recurrence Rates and Surgical Outcomes. *Plast. Reconstr Surg* 2017;140:382e.
29. Kronowitz SJ, Mandujano CC, Lui J, et al. Lipofilling of the Breast Does Not Increase the Risk of recurrence of Breast Cancer: A Matched Controlled Study. *Plast. Reconstr Surg* 137: 385, 2016.
30. Bircoll M. Cosmetic breast augmentation utilizing autologous fat and liposuction techniques. *Plast Reconstr Surg* 1987;79:267–271.
31. Bircoll M, Novack BH. Autologous fat transplantation employing liposuction techniques. *Ann Plast Surg* 1987;18:327–329.
32. Hartrampf Jr CR, Bennett GK. Autologous fat from liposuction for breast augmentation. *Plast Reconstr Surg* 1987;80:646.
33. Ettelson CD. Fat autografting (letter to the editor). *Plast Reconstr Surg* 1987;80:646–647.
34. Ousterhout DK. Breast augmentation by autologous fat injection. *Plast Reconstr Surg* 1987;80:868–869.
35. Bircoll M. Reply. *Plast Reconstr Surg* 1987;80:647.
36. Bircoll M. Autologous fat transplantation to the breast. *Plast Reconstr Surg* 1988;82:361–362.
37. Brown FE, Sargent SK, Cohen SR, Morain WD. Mammographic changes following reduction mammoplasty. *Plast Reconstr Surg* 1987;80:691–698.
38. Abboud M, Vadoud-Seyedi J, De Mey A, et al. Incidence of calcifications in the breast after surgical reduction and liposuction. *Plast Reconstr Surg* 1995;96:620.
39. Chala LF, De Barros N, De Camargo Moraes P, et al. Fat necrosis of the breast: mammographic, sonographic, computed tomography and magnetic resonance imaging findings. *Curr Probl Diagn Radiol* 2004;33.
40. Yunus M, Ahmed N, Masroor I, et al. Mammographic criteria for determining the diagnostic value of microcalcifications in the detection of early breast cancer. *J Pak Med Assoc* 2004;54:24.
41. Pinell-White XA, Etra J, Newell M, et al. Radiographic Implications of Fat Grafting to the Reconstructed Breast. *The Breast Journal* 2015;21(5):520–525.
42. Cao Y, Sun Z, Liao L, et al. Human adipose tissue-derived stem cells differentiate into endothelial cells in vitro and improve postnatal neovascularization in vivo. *Biochem. Biophys Res* 2005;332(2):370-379.

43. Petit JY, Rietjens M, Botteri E, et al. Evaluation of fat grafting safety in patients with intraepithelial neoplasia: a matched-cohort study. *Ann Oncol* 2013;24:1479–8444.
44. Chan CW, McCulley SJ, Mcmillan RD. Autologous fat transfer – a review of the literature with focus on the breast cancer surgery. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 2008;61:1438-1448.
45. Missana MC, Laurent I, Barreau L, et al. Autologous fat transfer in reconstructive breast surgery: indications, technique and results. *EJSO* 2007;33:685-90.
46. Toledo LS. Syringe liposculpture. *Clin Plast Surg* 1996;23:683-693.
47. Khouri RK, Khouri RE, Lujan-Hernandez JR, et al. Diffusion and Perfusion: The Keys to Fat Grafting. *Plast Reconstr Surg Glob Open* 2014;2(9):e220.
48. Rosen ED, MacDougald OA. Adipocyte differentiation from the inside out. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006;7:885–96.
49. Cao R, Brakenhielm E, Wahlestedt C, Thyberg J, Cao Y. Leptin induces vascular permeability and synergistically stimulates angiogenesis with FGF-2 and VEGF. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:6390–5.
50. Novakofski J. Adipogenesis: Usefulness of in vitro and in vivo experimental models. *J Anim Sci* 2004;82:905–15.
51. Bourin P, Bunnell BA, Casteilla L, et al. Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: A joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the International So. Cytotherapy 2013;15:641–8.
52. Crisan M, Yap S, Casteilla L, Chen CW, Corselli M, Park TS, et al. A Perivascular Origin for Mesenchymal Stem Cells in Multiple Human Organs. *Cell Stem Cell* 2008;3:301–13.
53. Christiaens V, Lijnen HR. Angiogenesis and development of adipose tissue. *Mol Cell Endocrinol* 2010;318:2–9.
54. Frye C a, Wu X, Patrick CW. Microvascular endothelial cells sustain preadipocyte viability under hypoxic conditions. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 2005;41:160–4.
55. De Ugarte DA, Morizono K, Elbarbary A, Alfonso Z, Zuk PA, Zhu M, et al. Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow. *Cells Tissues Organs* 2003;174:101–9.

56. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999;284:143-7.
57. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, et al. Human Adipose Tissue Is a Source of Multipotent Stem Cells. *Mol Biol Cell* 2002;13:4279–95.
58. Oedayrajsingh-Varma MJ, van Ham SM, Knippenberg M, Helder MN, Klein-Nulend J, Schouten TE, et al. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cell yield and growth characteristics are affected by the tissue-harvesting procedure. *Cytotherapy* 2006;8:166–77.
59. Bunnell BA, Flaat M, Gagliardi C, Patel B, Ripoli C. Adipose-derived stem cells: Isolation, expansion and differentiation. *Methods* 2008;45:115-20.
60. Von Heimburg D, Hemmrich K, Haydarlioglu S, Staiger H, Pallua N. Comparison of viable cell yield from excised versus aspirated adipose tissue. *Cells Tissues Organs* 2004;178:87–92.
61. Pu LLQ. Mechanisms of fat graft survival. *Ann Plast Surg* 2016;77:S84–6.
62. Khouri RKJ, Khouri RK. Current Clinical Applications of Fat Grafting. *Plast Reconstr Surg* 2017;140:466e–486e.
63. Eto H, Kato H, Suga H, Aoi N, Doi K, Kuno S, et al. The fate of adipocytes after nonvascularized fat grafting: Evidence of early death and replacement of adipocytes. *Plast Reconstr Surg* 2012;129:1081–92.
64. Pu LL, Coleman SR, Cui X, et al. Cryopreservation of autologous fat crafts harvest with the Coleman technique. *Ann Plast Surg*. 2010;64:333-337.
65. Gao DY, Critser JK. Mechanisms of cryoinjury in living cells. *Inst Lab Anim Resour J*. 2000;41:187-196.
66. Jang TH, Park SC, Yang JH, et al. Cryopreservation and its clinical applications. *Integr Med Res* 2017;6:12–18.
67. Wolfe J, Bryant G. Cellular cryobiology: thermodynamic and mechanical effects. *International Journal of Refrigeration* 2001;24:438-450.
68. Su SC, Garbers S, Rieper TD, et al. Temperature variations in upright mechanical freezers. *Cancer Epidemiologic Biomarkers* 1996;5:139-140.
69. Pegg DE. Principles of cryopreservation. In: Day JG, Stacey GN, editors. *Cryopreservation and freeze-drying protocols - Methods in molecular biology*, 2thed. New Jersey: Humana Press Inc;2007, p 39-57.

70. Pegg DE. The history and principles of cryopreservation. *Semin Reprod Med* 2002;20:5-13.
71. Hubálek Z. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. *Cryobiology* 2003;46:205–229.
72. Erdag G, Eroglu A, Morgan JR, Toner M. Cryopreservation of fetal skin is improved by extracellular trehalose. *Cryobiology* 2002; 44:218-28.
73. McGann LE, Walterson ML. Cryoprotection by dimethyl sulfoxide and dimethyl sulfone. *Cryobiology* 1987;24:11-16.
74. Shu Z, Gao D, Pu LLQ. Update on Cryopreservation of Adipose Tissue and Adipose- derived Stem Cells. *Clin Plastic Surg* 2015;42:209–218.
75. 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;29:248–252.
76. Cui X, Pu LLQ. The Search for a Useful Method for the Optimal cryopreservation of AdiposeAspirates: Part II. In Vivo Study. *Aesthetic Surgery Journal* 2010;30(3) 451–456.
77. Atik B, Ozturk G, Erdogan E, et al. Comparison of techniques for long-term storage of fat grafts: an experimental study. *Plast Reconstr Surg* 2006;118:1533-1537.
78. MacRae JW, Tholpady SS, Ogle RC, et al. Ex vivo fat graft preservation: effects and implications of cryopreservation. *Ann Plast Surg* 2004;52:281-283.
79. Pu LL. Re: Comparison of techniques for long-term storage of fat grafts. *Plast Reconstr Surg* 2007;120:813.
80. Pu LLQ, Cui X, Li J, et al. The Fate of Cryopreserved Adipose Aspirates After In Vivo Transplantation. *Aesthetic Surg J* 2006;26:653–661.
81. Cui XD, Gao DY, Fink BF, et al. Cryopreservation of human adipose tissues. *Cryobiology* 2007;55:269–278.
82. Mugishima H, Harada K, Chin M, Suzuki T, Takagi K, Hayakawa S, et al. Effects of long-term cryopreservation on hematopoietic progenitor cells in umbilical cord blood. *Bone Marrow Transplant* 1999;23:395-396.
83. Pu LL. Comparison of techniques for long-term storage of fat grafts. *Plast Reconstr Surg* 2007;120:813.
84. Gilmore HA, Liu J, Gao DY, Critser JK. Determination of optimal cryoprotectants and procedures for their addition and removal from human spermatozoa. *Hum Reprod* 1997;12:112-118.

85. Pu LLQ, Cui X, Fink BF, et al. Cryopreservation of Adipose Tissues: The Role of Trehalose. *Aesthetic Surg J* 2005;25:126-131.
86. Pellerin-Mendes C, Million L, Marchand-Arvier M, Labrude P, Vigneron C. In vitro study of the protective effect of trehalose and dextran during freezing of human red blood cells in liquid nitrogen. *Cryobiology* 1997;35:173-186.
87. Ntai A, La Spada A, De Blasio P, Biunno I. Trehalose to cryopreserve human pluripotent stem cells. *Stem Cell Res.* 2018;31:102-112.
88. Sztejn JM, Noble K, Farley JS, Mobraaten LE. Comparison of permeating and nonpermeating cryoprotectants for mouse sperm cryopreservation. *Cryobiology* 2001;41:28-39.
89. Pu LL. Cryopreservation of adipose tissue. *Organogenesis* 2009;5(3):138-42.
90. Ashjian PH, DeUgarte DA, Katz AJ, Hedrick MH. Lipoplasty: From body contouring to tissue engineering. *Aesthetic Surg J* 2002; 22:121-7.

6 ARTIGO – LÍNGUA INGLESA

CRYIOPRESERVED ADIPOSE CELLS VIABILITY: A FUTURE PERSPECTIVE TO EXPAND THE LIPOFILLING IN BREAST RECONSTRUCTION.

Márcia Portela de Melo, MD¹

Gabriela dos Santos Sant'Anna, MSc, PhD

Diego Mendonça Uchoa, MD, PhD⁴

Jeferson Piaia Dalmago⁵

Jorge Villanova Biazús, MD, PhD⁶

Ilma Simoni Brum, MSc, PhD⁶

1. MD. Breast Surgeon. Breast Unit – HCPA*.
2. MSc, PhD. Molecular Biologist of IHS# - Physiology Department – UFRGS&.
3. MD, PhD. Pathologist of Clinical Pathology Unit – HCPA*.
4. Biomedical Academic Student – Biomedicine School - UFRGS&.
5. MD, PhD. Professor of Gynecology and Obstetrics Department. Medicine School – UFRGS&. Head of Breast Unit – HCPA*.
6. MSc, PhD. Professor of Physiology Department – IHS# - UFRGS&. Head of IHS# – UFRGS&.

*Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA)

#Institute of Health Sciences (IHS) – Instituto de Ciências Básicas da Saúde

&Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

ABSTRACT

Autologous fat grafting (lipofilling) application has been increasing in many types of breast reconstruction surgeries. The viability of fat grafts harvested with an established technique after cryopreservation remains unknown. In this study, the viability of autologous fat grafts harvested with the Coleman technique after application of a cryopreservation protocol for adipose tissue with two different methodologies of cryoprotective agents at different storage times was analyzed. Twelve adult female patients were enrolled in this study. In each patient 30mL of fat grafts were harvested with the Coleman technique and divided in groups. In group 1, 10mL of fresh fat graft without cryopreservation served as control. In group 2, 10mL of the fat graft was mixed with cryoprotective agents DMSO and trehalose. In group 3, 10mL of the fat graft was mixed with trehalose. The fat grafts with cryoprotective agents underwent cryopreservation with controlled slow cooling and fast rewarming. The fat graft samples from all groups were analyzed with trypan blue for viable adipocyte count, glycerol-3-phosphatase dehydrogenase assay, and histology. Viable adipocyte counts were found similar in all groups at 20min and 6 months of cryopreservation (p 0.156 and p 0.410). The glycerol-3-phosphatase dehydrogenase activity was maintained in all groups after 6 months of cryopreservation (p 0.189). Histologically, the normal structure of fragmented fatty tissues was found in all groups. Our results indicate that autologous fat grafts harvested based on Coleman technique and cryopreserved with these cryoprotective agents maintain its viability, structure, and functionality. The encouraging results from this study justify that further research be carried out to refine this cryopreservation protocol and support subsequent in vivo trials.

Key Words: fat graft, breast reconstruction, Coleman technique, cryopreservation

INTRODUCTION

The interest in autologous fat grafting (lipofilling) was reawakened in the early 1990s following the work of Coleman⁽¹⁻⁴⁾. Its application has been increasing in many types of breast surgeries⁽²⁻⁶⁾ since breast volume, shape, projection, consistency and contour can be enhanced with this technique. The autologous fat grafting can be a good solution to repair defects after breast cancer surgical treatment and reconstruction⁽⁶⁻¹¹⁾, it can reduce the indication for more extensive surgeries such as myocutaneous flaps with satisfactory results⁽⁵⁾. This technique is used to treat tissue damages and deformities after breast radiotherapy⁽¹²⁾, thoracic malformations and also for breast augmentation and other cosmetic purposes⁽¹³⁾. The autologous fat grafting is an excellent technique to correct breast defects after breast conservative surgery^(6,14).

It is a safe technique with a small rate of postoperative complications but it is still very difficult to predict the percentage of the fat-graft survival⁽¹¹⁾. This variable rate of absorption in the grafted site, which can reach 30-50% of the filled volume is one of the main obstacles to achieve long-term favorable results of breast volume and projection⁽¹¹⁻¹⁴⁾. The high rate of fat graft absorption causes the need of overcorrection and, in many cases, repeated procedures in the reconstruction area, associated with greater discomfort for patient, fat necrosis in the recipient area, increased morbidity and costs and repeated traumas in the donor area.

Fat grafts must obtain oxygen via diffusion until neovascularization occurs, this means there are limits for the volume we can inject in each lipofilling session to do not compromised the local capillary perfusion^(11,13-17). Then the excess fat grafts obtained from the procedure are discarded or the liposuction procedure is interrupted, even if the patient still has a donor area with satisfactory volume and quality. There is a strong desire to be able to preserve this adipose tissue harvested for potential future applications^(18,19). A lot of studies have been done to develop a better technique for long-term preservation of adipose tissue for possible use in repeated lipofilling⁽¹⁸⁻²⁵⁾.

Although some studies discuss and report the long-term adipose tissue preservation, the possibility of develop and compare this cryopreservation techniques,^(18,24) maintaining the adipose tissue harvested viability in our laboratory remains unknown. In this study, we explore the cryopreserved adipose tissue viability

after application of a protocol with two different methodologies of cryoprotective agents at different storage times.

MATERIALS AND METHODS

This is a noninferiority study comparing the viability of fresh adipose tissue and cryopreserved adipose tissue after application of a protocol with two different methodologies of cryoprotective agents at different storage times. The study was approved by the Research Ethics Committee of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), in accordance with the Helsinki Declaration. We selected 12 female patients from the Breast Unit of HCPA, all of them underwent breast surgery with lipofilling by the Coleman technique^(1,3) alone or associated with another breast reconstruction procedure between 2017 and 2018. Patients were invited to participate and signed the written informed consent after understanding the study aims and methods. Data on patient medical history, type of primary surgery and breast reconstruction, lipofilling procedures were retrieved from the HCPA System Database.

The sample size calculation was performed through WinPEPI (*Programs for Epidemiologists for Windows*) version 11.63, based on the proportions described by Pu LL et al. (2010)⁽²⁴⁾ for the number of viable adipose cells. Thus, considering 95% confidence interval, means \pm standard deviation for the samples of fresh fat graft ($3.46 \pm 0.91 \times 10^6/\text{mL}$) and cryopreserved fat graft ($4.12 \pm 1.11 \times 10^6/\text{mL}$)⁽²⁰⁾, 80% statistical power, 10% estimated loss and accepted error of 0.7 units in a noninferiority study, the calculated minimum sample size was 10 patients (adipose tissue samples) in each group (N=30).

Adipose tissue harvesting and lipofilling

The adipose tissue was harvested and prepared based on Coleman technique published in 1995^(1,3,4). The adipose tissue was harvest using a 60cc syringe attached to a manual aspiration cannula of 3mm or 5mm and 15 or 23cm in length from the subcutaneous tissue, usually from the abdomen or from other donor sites according to the morphology of the patient. The material was centrifuged at 3000rpm for 3 minutes to remove oily (upper level) and blood cells contaminants (lower level) and then obtain

an adipocyte-concentrated preparation (middle level). Then, 30mL of this adipose tissue fraction obtained was used in this study.

The 30mL adipose tissue samples of each patient (N=12), was divided in 3 groups as described below:

- Group 1 (“control” group) – Fresh adipose tissue: 2mL was put immediately in 10% buffered formalin and the other 1mL was prepared for viable adipocyte count with trypan blue.
- Group 2 – Cryopreserved adipose tissue with DMSO 0,5M and trehalose 0,2M: 10mL adipose tissue samples of each patient was divided in 1mL smaller fractions and underwent to cryopreservation procedure with a solution of two cryoprotective agents combination (DMSO 0,5M and trehalose 0,2M) with 1:1 volume (solution and adipose tissue).
- Group 3 – Cryopreserved adipose tissue with trehalose 0,35M: 10mL adipose tissue samples of each patient was divided in 1mL smaller fractions and underwent to cryopreservation procedure with a solution of only trehalose 0,35M with 1:1 volume (solution and adipose tissue).

Fresh adipose tissue (Group 1) and cryopreserved adipose tissue (Group 2 and Group 3) quality was analyzed through the procedures: viable adipose cells count (1mL sample), glycerol-3-phosphate dehydrogenase (G3PDH) activity assay (2mL sample) and histology (2mL sample). The viable adipose cells count and histology were performed in fresh adipose tissue samples (Group 1 - “control” group) and in cryopreserved adipose tissue samples (Group 2 and 3) thawed after stabilized in liquid nitrogen at -196°C for about 20 minutes and again after a mean time of cryopreservation for 6 months. At this time (6 months), the G3PDH activity assay was performed in the cryopreserved adipose tissue samples (Group 2 and 3).

Cryopreservation and thawing adipose cells protocol

Adipose tissue cryopreservation was developed with two different cryoprotective agents (CPA): dimethyl sulfoxide (DMSO) (Sigma, St. Louis, MO) and trehalose (Merck S/A, Brazil). DMSO is a permeable CPA that stabilizes lipid membranes, reduces intracellular ice formation and trehalose is a nonpermeable CPA that may contribute to stabilize proteins and cell membranes⁽²⁴⁻²⁶⁾. After harvested and centrifugated as the Coleman technique, adipose fresh tissue sample of each patient

was divided in a smaller portion (3mL) in Group 1 (N=12) and the others 20mL divided in 1mL portions aliquot into cryotubes (10mL for Group 2 and 10mL for Group 3).

The cryoprotective solutions were prepared as follows: 10mL solution of PBS mixed with DMSO 0.5M (3.3%) and trehalose 0.2M (7.6%)⁽²⁴⁾ was prepared for the samples of Group 2 (N=12) and other 10mL solution of PBS mixed with trehalose 0.35M⁽²⁵⁾ was prepared for Group 3 (N=11). These solutions were aliquoted in 1mL into cryotubes with 1mL portion of adipose tissue samples (1:1). After mixed with the ACPs, the cryotubes were placed in room temperature for 10 minutes and then put into a freezing system (Thermo Scientific™ Mr. Frosty™ Freezing Container) of stable and slow cooling rate from 22°C to -30°C for 1 hour. This freezing system was designed to achieve a rate cooling very close to -1°C per minute after placed into a freezer at -80°C, the optimal rate for cell preservation, avoiding intracellular ice crystal formation⁽²⁴⁾. After, the cryotubes were transfer into a liquid nitrogen container at -196°C.

Part of the cryopreserved samples were thawing after stabilized in liquid nitrogen for about 20 minutes, which is considering as the condition equivalent to a long-term preservation with no structural changes because at that storage temperature chemical reactions cannot occur^(19,24,28). The other samples were thawing after a mean time cryopreservation of 6 months. For thawing process, the cryotubes was taken off from the liquid nitrogen and placed at room temperature for 2 minutes on nitrogen liquid vaporization and then they were placed in 37°C water bath for 5 minutes. After thawing, the samples were centrifuged at 2000rpm for 2 minutes with the separation and withdrawal of the ACPs (lower level) and then analyzed as previously described.

Viable adipose cells count

One-mL fresh adipose tissue sample (Group 1) and 1mL adipose tissue sample thawing after cryopreservation (Group 2 and Group 3) were enzymatically digested using 1mL of type I collagenase 1mg/mL (Sigma, St. Louis, MO) in PBS with 5% bovine serum albumin (Sigma, St. Louis, MO) and were incubated at 37°C for 1 hour with a speed shaking of 85rpm. The digestion was stopped by 3mL culture medium containing 20% of fetal bovine serum. The remaining adipose tissue was centrifugated at 1100rpm for 10 minutes and was fractionated into mature adipocytes (top layer – supernatant) and stromal agglomerates (bottom layer). The viable adipose cells (top layer) count was determined through the dilution of 100μL digested sample

with 100 μ L 0.4% trypan blue (Sigma, St. Louis, MO) and counted on a Neubauer hemocytometer using an inverted microscope at 200-400x magnification.

Glycerol-3-phosphate dehydrogenase (G3PDH) activity assay

Glycerol-3-phosphate dehydrogenase (G3PDH) is an important component of carbohydrate and lipid metabolic processes. This enzyme catalyzes the reversible conversion of dihydroxyacetone phosphate and NADH to glycerol-3-phosphate and NAD⁺. G3PDH activity may be an indicator of cell tolerance to stress situations and was used to analyze the adipose cell function after cryopreservation. The higher enzyme level means a better cellular function^(24,29). The *Glycerol 3-Phosphate Dehydrogenase Activity Colorimetric Assay Kit* (Sigma-Aldrich – MAK208) provides the G3PDH activity in different tissues and cells by colorimetric measuring NADH concentration with absorbance at 450nm (A_{450}) proportional to enzyme activity present in 50 μ L of each sample at two different evaluation times (0 and 60 minutes)⁽³⁰⁾. The glycerol-3-phosphate concentration, intermediate of the glycolysis metabolic pathway and important in the exchanges between cytosol and mitochondrial matrix (G3P shuttle), was also calculated based on the absorbance values on the curve.

The *NADH Standards* were prepared in different concentrations, generating a standard curve (0, 2.5, 5.0, 7.5, 10 and 12.5nmole/well). All the samples and *NADH Standards* were analyzed in duplicate and prepared according to protocol available in www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/mak208⁽³⁰⁾.

Histology

Two-mL fresh adipose tissue sample (Group 1) and 2mL adipose tissue sample thawing after cryopreservation (Group 2 and Group 3) were fixed in 10% buffered formalin, embedded in paraffin, sectioned at 5 μ m and stained with hematoxylin and eosin. All slides were analyzed by the same experienced pathologist in a single-blinded fashion for the sample group and cryopreservation time.

Cellular integrity, disruption architectural, as adipocyte degeneration and necrosis, and inflammatory areas were explored based on a score system modified from Shoshani and Ullmann (2005) scale to assess the presence of histologic parameters as follows: non-intact and non-nucleated fat cells; shrinkage; adipose cells with non-clustered organization in lobules; extracellular pseudocysts and vacuoles;

fibrosis and other components of connective tissue; inflammation, as evidenced by infiltration of lymphocytes and macrophages⁽³¹⁾. Histologic parameters presence was graded on a semiquantitative scale of 0 to 3 as follows: 0 = absence, 1 = minimal, 2 = moderate, 3 = extensive. The higher the value of total score, the greater was the alterations identified on adipose tissue sample. We added two widely adipose histological findings (shrinkage and adipose cells with non-clustered organization in lobules) to the parameters. The scale shown above was reduced from the original scale with six scores to be more objective and with less variability.

Statistical Analysis

Statistical Analysis was performed using SPSS, version 18.0. [PASW Statistics for Windows, Chicago: SPSS Inc.]. Categorical variables were described as absolute (n) and relative (n%) frequencies. Quantitative data was expressed as mean \pm SD or median and interquartile range (IQR), according the Shapiro-Wilk normality test. Quantitative variables were compared among groups by One-Way Analysis of Variance (One-Way ANOVA) for independent samples with Tukey *post hoc* test or by Kruskal-Wallis test with Dunn *post hoc*. Comparisons between two groups for enzymes assessed variables were carried out using the Mann-Whitney test for independent samples. The Wilcoxon test was used to obtain the intragroup comparisons between time measurements. Categorical frequencies were compared among groups by the Chi-Square test with adjusted residual analysis. The level of significance was set at 5% for all analysis.

RESULTS

The twelve female patients mean age was 52.50 ± 7.92 years (range 44–69) with a mean body mass index (kg/m^2) of 26.06 ± 2.84 . Majority of patients were diagnosed with invasive breast cancer and one of them was identified at high risk for hereditary breast cancer and had prophylactic bilateral mastectomy. Mean time from first surgery to lipofilling was 44.67 ± 26.53 months (range 12–90) and the median of total numbers of lipofillings per patient was 2.0 [IQR 1.00-2.75] with a maximal of 5.0 procedures in one patient.

In this study, the median cryopreservation time for each sample was 6.5 months (IQR = 6.0–8.0). Viable adipose cells count (Fig. 1) and histological analysis by hematoxylin-eosin staining with the total histology score value were performed in the fresh fat graft (Group 1) and all cryopreserved fat graft groups (Group 2 – DMSO and Trehalose; Group 3 – Trehalose) at two different times of preservation in liquid nitrogen (Table 1). No statistically significant difference between the three groups was seen at 20 minutes or 6 months of storage. Histologically, the normal structure of adipose tissue with some fragmentation was maintained in all groups and some degrees of adipose shrinkage were found also in the three groups (Fig. 2). The fragmentation in two times made difficult the absolute adipose cell count (HE – number of cells per 3 fields/400x). Maybe, because of this, we saw a very low statistical trend for a difference between the groups at 6 months for the absolute adipose cell count (p 0.049) (Table 1).

There was also no difference between all fat graft cryopreserved samples when comparing the two storage times (20 minutes vs. 6 months) for viable adipose cells count (p 0.249), histological modified scoring system (p 0.340) and absolute adipose cell count (p 0.109) by the Wilcoxon Signed Ranks Test.

When the fresh fat graft (Group 1) histologic parameters of the score system was compared one by one with the tissue scores of Group 2 and Group 3 for 20 minutes and 6 months no significant difference was observed (Table 2). There were no relevant histological differences between the fresh (Group 1) and cryopreserved (Groups 2 and 3) fat grafts samples. No evidence or minimal presence of fibrotic areas or inflammatory changes was identified in all groups. In one sample cryopreserved with trehalose (Group 3) and thawed after 20 minutes was seen the presence of tissue necrosis area.

The G3PDH activity assay was used to assess the intracellular function of fat graft after cryopreservation by a median time of 6.5 months [IQR 6.0-8.0] in Group 2 and Group 3. The G3PDH enzyme activity was tested in two fresh fat graft samples at the same time of fat graft cryopreserved samples as a control in addition to the standard. No significant statistically difference was seen between the groups (p 0.189) (Table 1). When Group 2 (DMSO and trehalose) was compared with group 3 (trehalose), the G3PDH activity was maintained after 6 months median time of cryopreservation (md 0.1156mU/mL vs. md 0.1159 mU/mL, p 0.342) (Fig. 3).

DISCUSSION

The autologous fat grafting has an important potential for reconstruction after breast cancer and others breast surgeries, specially based on Coleman technique published in recent years^(5-11,13). The need for a standard fat graft cryopreservation protocol that can be feasible and reproduced in our laboratory offers opportunity for solution the reabsorption problem during fat grafting and the need of further harvesting procedures. In order to develop a complete protocol, the literature was extensively reviewed. In this study, the adipose tissue was harvested and prepared based on Coleman technique published in 1995^(1,3). Cryopreservation was conducted with controlled slow cooling to -196°C , which reduces intracellular ice formation, and fast rewarming to 37°C , which reduces recrystallization and that seems to be the most appropriate for adipose tissue^(18,24,25), especially considering the sample volume and risk of contamination with others techniques^(27,28,32,33).

Although some authors have shown that fat grafts simply frozen in liquid nitrogen maintained its viability and histology similar to those of fresh grafts^(20,22), others studies indicated that the widely used practice of simple freezing leads to nonviable tissue and that cell survival can be improved by addition of a cryoprotective agent^(18,21,23,24,28,29). The fat grafts mixed with the cryoprotective agents underwent controlled freezing and thawing during cryopreservation. The preferred CPAs in the literature are dimethyl sulfoxide (DMSO)^(19,23,24,26,27) and trehalose^(18,24,25,34). Ideal concentrations are not conclusive. DMSO is tissue toxic at normal body temperature and should be removed from the previously cryopreserved cells or tissues after thawing by repeated washing steps⁽²¹⁾, because of this it would be desirable to use it at lower concentration in cryopreservation of adipose tissues. It is possible adding another non-tissue toxic cryoprotective agent, such as trehalose^(25,34,35). The two CPAs may significantly enhance the protective effect of adipose tissue during cryopreservation through a possible synergistic mechanism, but details of this process remain uncertain⁽³⁴⁾. Trehalose, in its optimal concentration, also appears to offer similar protection provided by DMSO and trehalose as a CPA^(25,35,36).

In this study, the autologous fat graft harvested and centrifugated based on Coleman technique was cryopreserved with two different protocols of cryoprotective agents at different storage times, DMSO ant trehalose (group 2) and trehalose (group

3) as previously discussed. This groups were compared with fresh fat graft (group 1) also harvested based on Coleman technique. All the surgeries were made by the same breast surgeon group that works at a university hospital. The results from this study demonstrate that all groups (fresh and cryopreserved DMSO and trehalose or only trehalose) have similar viable adipose cells count by trypan blue at the both different time of cryopreservation. The histological analyses showed that the basic structure of adipose tissue was maintained in all groups and all storage times, despite the fragmentation expected by the harvest technique. This fragmentation in two times made difficult the absolute adipose cell count (HE – 3 fields/400x). Maybe, because of this, we saw a very low statistical trend for a difference between the groups at 6 months for the absolute adipose cell count (p 0.049). Only one sample presented necrosis area after been cryopreserved with trehalose and probably this occurred before the storage process. This sample was of a patient that had underwent three lipofilling surgeries before with fat graft harvested from the abdomen, flanks, and lateral thighs.

In order to make the histological evaluation less subjective, we use a semiquantitative scale modified from Shoshani and Ullmann (2005) scale⁽²⁶⁾ and by this scale the higher the value of total score, the greater was the alterations identified on adipose tissue sample. When all groups were compared, they had very low and similar total histology score values (HE) without statistical difference at any cryopreservation time (20 minutes or 6 months). We also compare each histological parameter individually and there is no difference between the groups at different cryopreservation times, especially in relation to the presence of shrinkage and adipose cells with non-clustered and organization in lobules.

The fat grafts cryopreserved with the two different CPAs schemes maintained G3PDH activity after a 6.5 months median time of cryopreservation. When this same two groups with DMSO and trehalose and only with trehalose were compared with fresh fat graft samples harvested with the same Coleman technique, G3PDH enzyme activity did not showed any difference.

The results from this study appear to be in line with previous studies that showed the optimal CPAs combination of 0.5M (3.3%) DMSO and 0.2M (7.6%) trehalose^(18,24,36) with a normal histology and near the same number of viable adipocytes as compared with the fresh fat grafts. Although, cryopreserved fat grafts appear to have a less optimal level of adipocyte specific G3PDH enzyme activity compared with the fresh ones in those studies^(18,24). At the same time, the optimal

concentration of trehalose was explored and a concentration of 0.35 mol/L appears to provide the optimal protection of adipose aspirates during cryopreservation *in vitro* and *in vivo*^(25,37). Trehalose (0.35M) was used in our study and for the first time compare with DMSO and trehalose for cryopreservation of fat graft harvested with the Coleman technique at the same study. The fat graft viability after long-term preservation with trehalose did not differ from the results with DMSO and trehalose.

CONCLUSION

The fat graft cryopreservation with CPAs has promising results and appears to provide adequate protection for fat graft harvested with the Coleman technique. The sufficient evidence that fat grafts keep their viability after optimal cryopreservation protocol, can be a solution for the unpredictable fat graft reabsorption and the need for repeated liposuctions to treat soft tissue defects caused by trauma, cancer, congenital anomalies, painful scars, irradiation injuries and aesthetic indications. It could be also a potential source of adipose-derived stem cells (ASCs) for tissue engineering and regenerative medicine applications. This study was succeeded in cryopreserved the fat graft based on previous studies, using a protocol with different methodologies of CPAs. The encouraging results justify that further research be carried out to refine this cryopreservation protocol and support subsequent *in vivo* trials.

ARTICLE

TABLES AND FIGURES

Table 1. Evaluation of tissue viability comparing fresh and cryopreserved adipose tissue at 20 minutes and 6 months in liquid nitrogen (-196°C).

Variable	Fresh adipose tissue	Cryopreserved adipose tissue DMSO + Trealose	Cryopreserved adipose tissue Trealose	*p-value
20 minutes[‡]				
Viable adipose cells count – trypan blue (x10 ⁴ cells/mL) – md [IQR]	303.80 [261.00–311.80]	274.49 [239.43–309.56]	271.74 [236.24–294-25]	0.156
Total histology score value (HE) – md [IQR]	5.00 [3.00–6.75]	7.00 [4.25–8.00]	5.00 [5.00–7.00]	0.226
Absolute adipose cell count (HE) (3 fields/400x) – mean ± SD (minimal–maximal)	28.04 ± 4.50 (22.00–36.30)	28.11 ± 4.69 (20.00–34.00)	29.54 ± 4.89 (23.30– 37.60)	0.696
6 months				
Viable adipose cells count – trypan blue (x10 ⁴ cells/mL) – mean ± SD [Ⓔ] (minimal–maximal)	288.49 ± 33.87 (225.74–336.50)	282.32 ± 23.06 (254.24–324.50)	273.78 ± 18.47 (249.24–296.50)	0.410
Total histology score value (HE) – md [IQR] [Ⓔ]	5.00 [3.00–6.75]	3.00 [3.00–5.25]	6.00 [4.00–6.00]	0.317
Absolute adipose cell count (HE) (3 fields/400x) – mean ± SD [Ⓔ] (minimal–maximal)	28.04 ± 4.50 (22.00–36.30)	34.10 ± 3.31 (31.60–38.60)	33.00 ± 2.82 (31.00–35.00)	0.049
G3PDH activity (mU/mL) – md [IQR] [Ⓔ]	0.1876 [0.1770–0.1876]	0.1156 [0.1002–0.5278]	0.1159 [0.0415–0.1542]	0.189

Legend: md – median. IQR – interquartile rang. SD - standard deviation. HE- hematoxylin-eosin. G3PDH – glycerol-3-phosphate dehydrogenase.

*For comparing the 3 groups Kruskal-Wallis Test (*post hoc* de Dunn) or One-Way ANOVA (*post hoc* de Tukey) were used. Significance level was set at 5% for all analysis.

20 minutes[‡]: fresh adipose tissue N=12, cryopreserved adipose tissue DMSO + trehalose N=12, cryopreserved adipose tissue trehalose N=11;

6 months: [Ⓔ] fresh adipose tissue N=12, cryopreserved adipose tissue DMSO + trehalose N=11, cryopreserved adipose tissue trehalose N=11;

[Ⓔ] fresh adipose tissue N=12, cryopreserved adipose tissue DMSO + trehalose N=4, cryopreserved adipose tissue trehalose N=3; [Ⓔ] fresh adipose tissue N=12, cryopreserved adipose tissue DMSO + trehalose N=4, cryopreserved adipose tissue trehalose N=2;

[Ⓔ] cryopreserved adipose tissue DMSO + trehalose N=11, cryopreserved adipose tissue trehalose N=10.

Table 2. Evaluation of histology score (HE) comparing fresh and cryopreserved adipose tissue at 20 minutes and 6 months in liquid nitrogen (-196°C).

Variable – Histology score ^{##} (HE)	Cryopreserved - 20min			<i>*p-value</i> [‡]	Cryopreserved – 6 meses			<i>*p-value</i> [§]
	Fresh adipose tissue (N=12)	Cryopreserved adipose tissue DMSO + Trealose (N=12)	Cryopreserved adipose tissue Trealose (N=11)		Cryopreserved adipose tissue DMSO + Trealose (N=4)	Cryopreserved adipose tissue Trealose (N=3)		
Non-intact and non-nucleated fat cells - n(n%)								
absence	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0.097	0(0.0)	0(0.0)	0.240	
minimal	7(58.3)	3(25.0)	2(18.2)		3(75.0)	0(0.0)		
moderate	4(33.3)	4(33.3)	7(63.6)		1(25.0)	3(100.0)		
extensive	1(8.3)	5(41.7)	2(18.2)		0(0.0)	0(0.0)		
Shrinkage - n(n%)								
absence	1(8.3)	1(8.3)	0(0.0)	0.451	0(0.0)	1(33.3)	0.165	
minimal	9(75.0)	6(50.0)	8(72.7)		3(75.0)	0(0.0)		
moderate	2(16.7)	3(25.0)	3(27.3)		1(25.0)	2(66.7)		
extensive	0(0.0)	2(16.7)	0(0.0)		0(0.0)	0(0.0)		
Adipose cells with non-clustered organization in lobules - n(n%)								
absence	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0.173	0(0.0)	0(0.0)	0.295	
minimal	6(50.0)	3(25.0)	2(18.2)		3(75.0)	0(0.0)		
moderate	5(41.7)	4(33.3)	7(63.6)		1(25.0)	3(100.0)		
extensive	1(8.3)	5(41.7)	2(18.2)		0(0.0)	0(0.0)		
Pseudocysts and vacuoles extracellular - n(n%)								
absence	11(91.7)	12(100.0)	11(100.0)	0.373	4(100.0)	3(100.0)	0.735	
minimal	1(8.3)	0(0.0)	0(0.0)		0(0.0)	0(0.0)		

	moderate	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)		0(0.0)	0(0.0)	
	extensive	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)		0(0.0)	0(0.0)	
Fibrosis and other components of connective tissue - n(n%)								
	absence	8(66.7)	8(66.7)	8(72.7)	0.938	4(100.0)	3(100.0)	0.228
	minimal	4(33.3)	4(33.3)	3(27.3)		0(0.0)	0(0.0)	
	moderate	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)		0(0.0)	0(0.0)	
	extensive	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)		0(0.0)	0(0.0)	
Inflammation - n(n%)								
	absence	7(58.3)	10(83.3)	9(81.8)	0.295	4(100.0)	3(100.0)	0.138
	minimal	5(41.7)	2(16.7)	2(18.2)		0(0.0)	0(0.0)	
	moderate	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)		0(0.0)	0(0.0)	
	extensive	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)		0(0.0)	0(0.0)	

Legend: n - absolute frequency. n% - relative frequency. HE- hematoxylin-eosin.

^{##}Histology score system modified from *Shoshani and Ullmann scale (2005)*⁽²⁶⁾: 0 = absence, 1 = minimal, 2 = moderate, 3 = extensive.

*Comparisons by Pearson Chi-Square Test: [†]*p-value* - fresh fat graft vs. cryopreserved at 20min. [§]*p-value* - fresh fat graft vs. cryopreserved at 6 months.

Significance level was set at 5% for all analysis.

ARTICLE - FIGURES

Figura 1. Viable adipose cells stained with 0.4% trypan blue from fresh fat and cryopreserved fat graft thawed after 20 minutes (above) and after 6 months of cryopreservation (below). A – fresh fat graft; B and D – fat graft with DMSO and trehalose; C and E – fat graft with trehalose. (Original magnification x400).

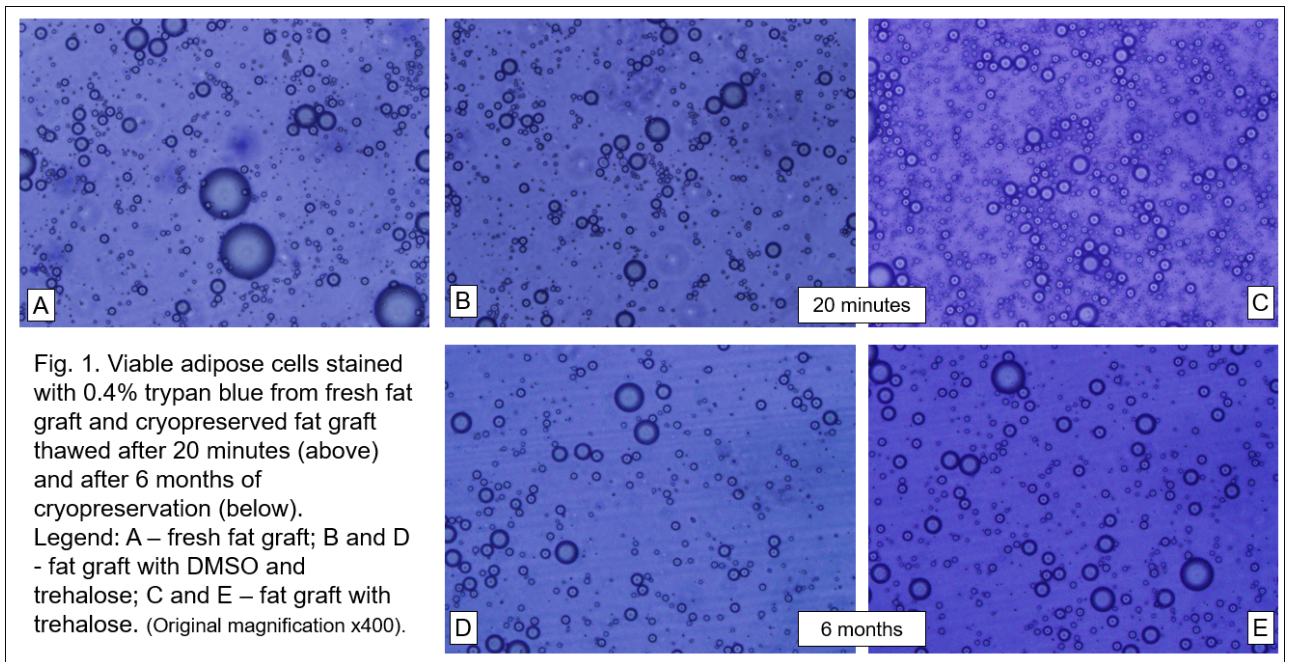


Figura 2. Histologic examination (HE, original magnification x100) show a well-retained adipose tissue structure with some fragmentation in all groups, associated with minimal shrinkage in cryopreserved fat graft samples (B and C). Legend: A – Fresh fat graft; B – Cryopreserved DMSO + Trehalose; C - Cryopreserved Trehalose.

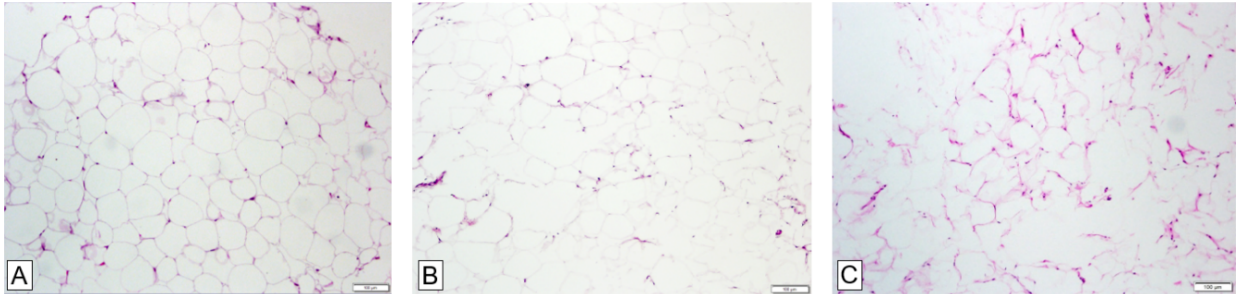
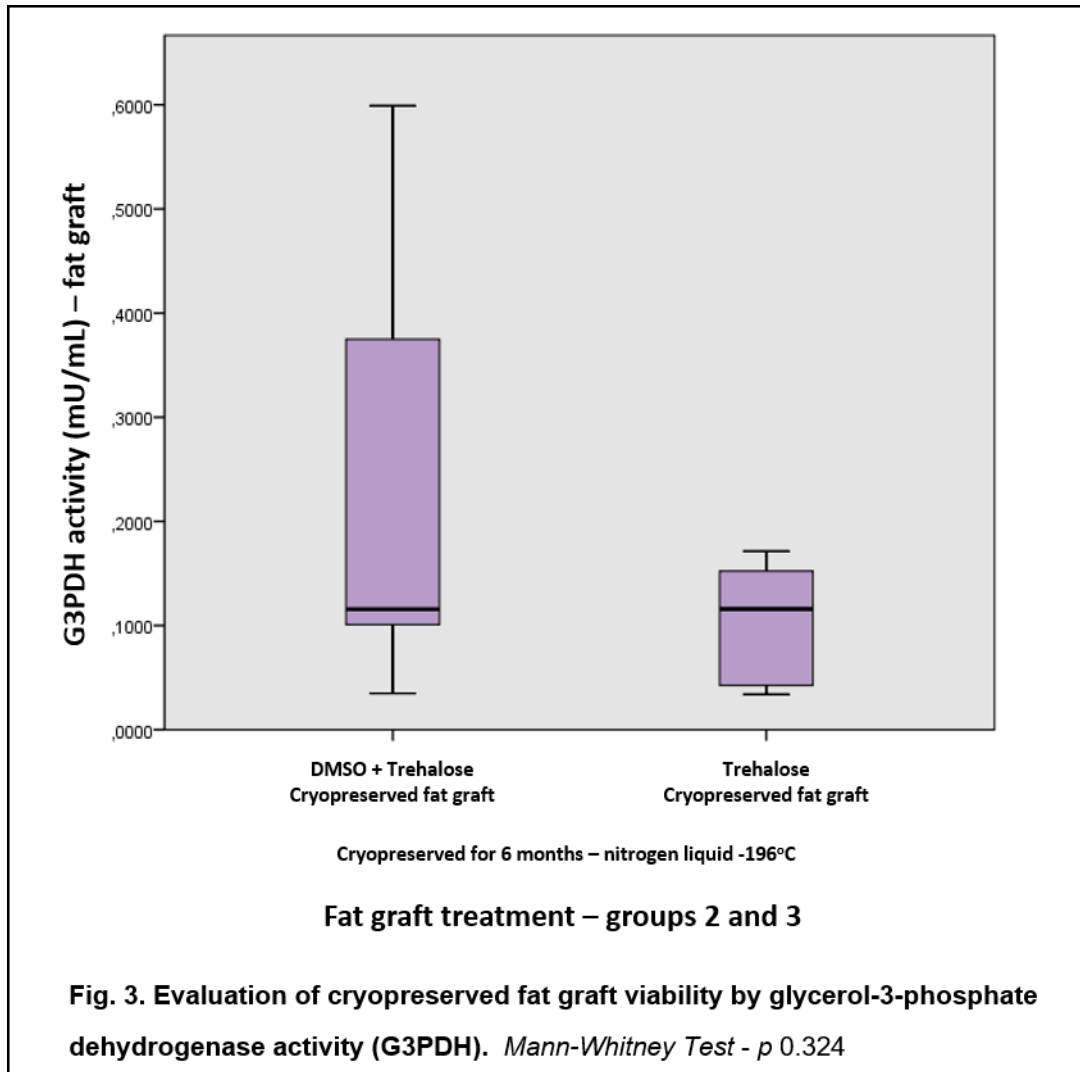


Fig. 2. Histologic examination (HE, original magnification x100) show a well-retained adipose tissue structure with some fragmentation in all groups, associated with minimal shrinkage in cryopreserved fat graft samples (B and C). Legend: A – Fresh fat graft; B – Cryopreserved DMSO + Trehalose; C - Cryopreserved Trehalose; HE - hematoxylin and eosin.

ARTICLE - FIGURES

Figura 3. Evaluation of cryopreserved fat graft viability by glycerol-3-phosphate dehydrogenase activity (G3PDH). *Mann-Whitney Test – p 0.324*



REFERENCES

1. Coleman SR. Long-term survival of fat transplants: controlled demonstrations. *Aesthetic Plast Surg* 1995;19:421–425.
2. Fournier PF. Facial recontouring with fat grafting. *Dermatol Clin* 1990;8:523–37.
3. Coleman SR. Structural fat grafting: More than a permanent filler. *Plast Reconstr Surg* 2006;118:108-20.
4. Coleman SR, Saboeiro AP. Fat grafting to the breast revisited: safety and efficacy. *Plast Reconstr Surg* 2007;119:775-785.
5. Delay E, Garson S, Tousson G, Sinna R. Fat Injection to the Breast: Technique, Results, and Indications Based on 880 Procedures Over 10 years. *Aesthet Surg J* 2009;29(5):360-376.
6. Biazús JV, Falcão CC, Parizotto AC, et al. Immediate Reconstruction with Autologous fat Transfer Following Breast-Conserving Surgery. *Breast Journal* 2015;21(3):268-75.
7. Delay E, Guerid S. The Role of Fat Grafting in Breast Reconstruction. *Clin Plastic Surg* 2015;42:315–323.
8. Petit JY, Botteri E, Lohsiriwat V, et al. Locoregional recurrence risk after lipofilling in breast cancer patients. *Annals of Oncology* 2012;23:582-588.
9. Petit JY, Maisonneuve P, Rotmensz N, et al. Safety of Lipofilling in Patients with Breast Cancer. *Clin Plastic Surg* 2015;42:339–344.
10. Sommer B, Sattler G. Current Concepts of Fat Graft Survival: Histology of Aspirated Adipose Tissue and Review of the Literature. *Dermatol Surg* 2000;26:1159–1166.
11. Rietjens M, De Lorenzi F, Rossetto F, et al. Safety of fat grafting in secondary breast reconstruction after cancer. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 2011;64:477-484.
12. Rigotti G, Marchi A, Galiè M, et al. Clinical treatment of radiotherapy tissue damage by lipoaspirate transplant: a healing process mediate by adipose-derived adult stem cells. *Plast Reconstr Surg* 2007;119:1409-1422.
13. Fournier PF. Fat grafting: my technique. *Dermatol Surg*. 2000;26(12):1117-28.
14. Biazus JV, Stumpf CC, Melo MP, et al. Breast-Conserving Surgery with Immediate Autologous Fat Grafting Reconstruction: Oncologic Outcomes. *Aesthetic Plast Surg*. 2018;42(5):1195-1201.

15. Billings EJr, May JJr. Historical review and present status of free fat graft autotransplantation in plastic and reconstructive surgery. *Plast Reconstr Surg* 1989;83:368-381.
16. Kaufmann 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;119:323-331.
17. Khouri RK, Khouri RE, Lujan-Hernandez JR, et al. Diffusion and Perfusion: The Keys to Fat Grafting. *Plast Reconstr Surg Glob Open* 2014;2(9):e220.
18. Pu LL, Cui X, Fink BF, et al. Long-term preservation of adipose aspirates after conventional lipoplasty. *Aesthet Surg J* 2004;24:536-541.
19. Pu LL. Re: Comparison of techniques for long-term storage of fat grafts. *Plast Reconstr Surg* 2007;120:813.
20. Atik B, Ozturk G, Erdogan E, et al. Comparison of techniques for long-term storage of fat grafts: an experimental study. *Plast Reconstr Surg* 2006;118:1533-1537.
21. Wolter TP, Heimburg DV, Stoffels I, et al. Cryopreservation of mature human adipocytes: in vivo measurement of viability. *Ann Plast Surg* 2005;55:408-413.
22. MacRae JW, Tholpady SS, Ogle RC, et al. Ex vivo fat graft preservation: effects and implications of cryopreservation. *Ann Plast Surg* 2004;52:281-283.
23. Moscatello DK, Dougherty M, Narins RS, et al. Cryopreservation of human fat for soft tissue augmentation: viability requires use of cryoprotectant and controlled freezing and storage. *Dermatol Surg* 2005;31:1506-1510.
24. Pu LL, Coleman SR, Cui X, et al. Cryopreservation of autologous fat crafts harvest with the Coleman technique. *Ann Plast Surg*. 2010;64:333-337.
25. 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;29:248–252.
26. Gao DY, Critser JK. Mechanisms of cryoinjury in living cells. *Inst Lab Anim Resour J*. 2000;41:187-196.
27. Pegg DE. The history and principles of cryopreservation. *Semin Reprod Med* 2002;20:5-13.
28. Pegg DE. Principles of cryopreservation. In: Day JG, Stacey GN, editors. *Cryoprevention and freeze-drying protocols - Methods in molecular biology*, 2thed. New Jersey: Humana Press Inc;2007, p 39-57.
29. Pu LLQ, Cui X, Fink BF, et al. Cryopreservation of Adipose Tissues:The Role of Trehalose. *Aesthetic Surg J* 2005;25:126-131.

30. *Glycerol 3-Phosphate Dehydrogenase Activity Colorimetric Assay Kit* (Sigma-Aldrich – MAK208) www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/mak208.
31. Shoshani O, Livne E, Armoni M, et al. The effect of interleukin-8 on the viability of injected adipose tissue in nude mice. *Plast Reconstr Surg* 2005;115:853.
32. Jang TH, Park SC, Yang JH, et al. Cryopreservation and its clinical applications. *Integr Med Res* 2017;6:12–18.
33. Wolfe J, Bryant G. Cellular cryobiology: thermodynamic and mechanical effects. *International Journal of Refrigeration* 2001;24:438-450.
34. Erdag G, Eroglu A, Morgan JR, Toner M. Cryopreservation of fetal skin is improved by extracellular trehalose. *Cryobiology* 2002; 44:218-28.
35. Pu LL. Cryopreservation of adipose tissue. *Organogenesis* 2009;5(3):138-42.
36. Pu LLQ, Cui X, Li J, et al. The Fate of Cryopreserved Adipose Aspirates After In Vivo Transplantation. *Aesthetic Surg J* 2006;26:653–661.
37. Cui X, Pu LLQ. The Search for a Useful Method for the Optimal cryopreservation of AdiposeAspirates: Part II. In Vivo Study. *Aesthetic Surgery Journal* 2010;30(3) 451–456.

7 CONCLUSÃO

Os estudos descritos na revisão indicam um caminho para a criopreservação com uso de ACPs como DMSO e trealose, combinados ou não e em diferentes concentrações, embora alguns destes resultados ainda possam ser menos satisfatórios, quando comparados ao enxerto de gordura fresco. Esta também é uma dificuldade encontrada para a criopreservação de outros tipos de tecidos.

Em nosso estudo, não foram identificadas diferenças significativas entre o enxerto de gordura fresco e o enxerto criopreservado através de protocolo de criopreservação com congelamento lento e controlado em N₂ líquido a -196°C, envolvendo duas diferentes metodologias de ACPs (DMSO 0,5M + Trealose 0,2M e Trealose 0,35M), baseado em ampla pesquisa e estudo na literatura. Mesmo quando avaliados os enxertos de gordura em diferentes momentos de criopreservação (após 6 meses de armazenamento) a viabilidade e similaridade entre os grupos se manteve. A possibilidade de podermos estudar, reproduzir, desenvolver e refinar protocolos de criopreservação como estes, abre uma porta para o futuro das cirurgias reconstrutoras e reparadoras da mama. Os resultados satisfatórios deste estudo com a aplicação do protocolo de criopreservação, utilizando dois diferentes esquemas de ACPs, justifica validar este protocolo e, no futuro, conduzir estudos *in vivo* e ensaios clínicos controlados.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Ao avaliar o enxerto de gordura autólogo é importante combinar diferentes testes de viabilidade celular e tecidual, trabalhando em conjunto com equipe de pesquisa multidisciplinar, aumentando nossa segurança ao comparar grupos submetidos a tratamentos tão diferentes. Também constituiu um desafio executar o teste de atividade da enzima G3PDH, específico para avaliar a função intracelular da célula adiposa. No desenvolvimento do estudo, foi possível criar uma metodologia a partir do protocolo estabelecido pelo fabricante do teste de atividade enzimática e executar o teste adequadamente, demonstrando não apenas a presença das células adiposas viáveis como também a função celular e mitocondrial preservada após no mínimo 6 meses de criopreservação.

9 PERSPECTIVAS

Realizar a diferenciação das células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo em amostras frescas de enxerto de gordura, padronizando o método, para após também buscar diferenciar nas amostras criopreservadas com os dois esquemas de agentes crioprotetores usados em nosso estudo, possibilitando comparar os resultados entre os grupos. A diferenciação celular será nas seguintes linhagens celulares: adipogênica, osteogênica e condrogênica. Após a diferenciação, essas células serão coradas e analisadas em microscópio invertido. Além disso, será realizada a avaliação da apoptose celular nas amostras criopreservadas (comparado com o controle – gordura fresca) através da técnica de citometria de fluxo (com uso de *kit* específico). Estas novas avaliações irão complementar a análise para validar o protocolo de criopreservação proposto e possibilitar novas pesquisas.

Por fim, a possibilidade de padronizar um protocolo viável para armazenar o enxerto de gordura autólogo a longo prazo para uso futuro, significa uma solução para a necessidade de hipercorreções e suas possíveis complicações, assim como para lipoaspirações repetidas nas áreas doadoras devido a taxa variável de absorção do enxerto. Paralelamente, criopreservar o enxerto de gordura autólogo poderá representar potencial para outras aplicações clínicas futuras na área da engenharia tecidual.

ANEXO 1

TABELAS COMPLEMENTARES – Características clínicas e sumário de eventos cirúrgicos apresentados nas Tabelas 1 e 2.

Tabelas

Tabela 1. Características clínicas das pacientes.

Variável	Total (N=12)
Idade (em anos) – média ± DP	52.50±7.92
(mínimo – máximo)	(44.00–69.00)
Índice de Massa Corporal (em kg/m ²) – média ± DP	26.06±2.84
(mínimo – máximo)	(19.90–30.60)
Tabagista – n(n%)	
Não	10(83.3)
Sim	2(16.7)
Comorbidades – n(n%)	
Diabetes mellitus tipo-2	1(8.3)
Dislipidemia	1(8.3)
Depressão	1(8.3)
HIV positivo	1(8.3)
HAS e depressão	3(25.0)
Ausente	5(41.7)
Cirurgia abdominal prévia – n(n%)	
Não	6(50.0)
Sim	6(50.0)
Avaliação genética: alto risco mutação – n(n%)	
Não	9(75.0)
Sim	3(25.0)
Causa da cirurgia inicial – n(n%)	
Carcinoma de mama	11(91.7)
Alto risco genético	1(8.3)
Diagnóstico histológico – n(n%)	
CDI	9(75.0)
CLI	1(8.3)
CA Misto	1(8.3)
Achados benignos	1(8.3)
Imunoistoquímica: classificação – n(n%)	
Luminal A	1(8.3)
Luminal B	5(41.7)
Luminal B híbrido	1(8.3)
Triplo negativo	2(16.7)
HER-2	2(16.7)
NA	1(8.3)

Estadiamento inicial: clínico e patológico – n(n%)		
	IA	2(16.7)
	IIA	3(25.0)
	IIB	1(8.3)
	IIIA	5(41.7)
	NA	1(8.3)
Quimioterapia – n(n%)		
	Não	1(8.3)
	Adjuvante	6(50.0)
	Neoadjuvante	4(33.3)
	NA	1(8.3)
Hormonioterapia – n(n%)		
	Não	4(33.3)
	Sim	7(58.3)
	NA	1(8.3)
Radioterapia (%)		
	Não	3(25.0)
	Sim	8(66.7)
	NA	1(8.3)

Legenda: n- frequência absoluta. n% - frequência relativa. DP – desvio padrão da média. HIV – vírus da imunodeficiência humana. DM2 – diabetes mellitus tipo 2. HAS – hipertensão arterial sistêmica. CDI – carcinoma ductal invasor. CLI – carcinoma lobular invasor. CA – carcinoma. HER2 – human epidermal growth fator receptor 2. NA – não se aplica.

Tabela 2. Sumário das cirurgias e eventos clínicos.

Variável	Total (N=12)
Tipo de cirurgia inicial: tratamento – n(n%)	
Mastectomia radical modificada	4(33.3)
Mastectomia poupadora de pele	1(8.3)
Mastectomia poupadora pele e mamilo	4(33.3)
Mastectomia total – simples	2(16.7)
Setorectomia e compensação geométrica	1(8.3)
Momento da reconstrução mamária – n(n%)	
Tardia – Lipoexertia	4(33.3)
Tardia	1(8.3)
Imediata	7(58.3)
Tipo de reconstrução – n(n%)	
TRAM - retalho reto abdominal	1(8.3)
Inserção de expansor pós-lipoexertia	1(8.3)
Inserção de prótese - tempo único	2(16.7)
Inserção expansor-prótese - dois tempos	3(25.0)
Retalho Grande dorsal e prótese	2(16.7)
Lipoexertia	3(25.0)
Tipo de intervenção axilar – n(n%)	
Ressecção de linfonodo sentinela	4(33.3)
Esvaziamento axilar	7(58.3)
NA	1(8.3)
Complicações maiores – n(n%)	
Perda parcial do retalho – necrose	1(8.3)
Retração cicatricial e perda de volume	1(8.3)
Associadas aos implantes:	
Contratura capsular	2(16.7)
Perda implante – infecção	1(8.3)
Deiscência de sutura e contratura capsular	1(8.3)
Ausente	6(50.0)
Indicação da lipoexertia – n(n%)	
Volume e simetria	4(33.3)
Plastrão - preparo para reconstrução	2(16.7)
Periprótese – contorno	4(33.3)
Reconstrução exclusiva com lipoexertia	2(16.7)
Intervalo entre a cirurgia inicial e a 1ª lipoexertia (em meses) – média ± DP	44.67±26.53
(mínimo – máximo)	(12.00–90.00)
Número total de lipoexertias – md [IIQ]	2.00 [1.00–2.75]
(mínimo – máximo)	(1.00–5.00)
Volume total lipoexertado por sessão de lipoexertia (em mL) – md [IIQ]	224.00[168.25–442.00]
(mínimo – máximo)	(80.00–927.00)
Exames de imagem da mama: seguimento – n(n%)	
BIRADS 2	10(83.3)
BIRADS 3	1(8.3)
NA	1(8.3)

Legenda: n- frequência absoluta. n% - frequência relativa. md – mediana. IIQ – intervalo interquartil. DP – desvio padrão da média. . NA – não se aplica. BIRADS – breast imaging-reporting and data system.

ANEXO 2

MATERIAL E MÉTODO – Protocolo

Estudo de não-inferioridade, comparando a viabilidade do tecido adiposo fresco e do tecido adiposo após aplicação de protocolo de criopreservação com dois diferentes esquemas de agentes crioprotetores, em diferentes tempos de armazenamento. O estudo foi aprovado pela Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), através da Plataforma Brasil, identificado pelo CAAE 48737415.0.0000.5327, conduzido no Serviço de Mastologia - HCPA, onde foi realizada a captação de pacientes e amostras. Os experimentos foram realizados na Unidade de Análise Moleculares e de Proteínas (UAMP) e na Unidade de Patologia Experimental (UPE) do Centro de Pesquisa Experimental - HCPA, conforme prévia autorização.

O cálculo amostral foi realizado através do programa WinPEPI (*Programs for Epidemiologists for Windows*) versão 11.63, baseado nas proporções descritas por Pull *et al.* (2010)⁽¹⁾ para o número de células adiposas viáveis por azul Trypan. Desta forma, considerando o intervalo de confiança 95%, as médias \pm desvio padrão para as amostras de gorduras frescas (3.46 ± 0.91) e criopreservadas (4.12 ± 1.11)⁽¹⁾, um poder de 80%, uma estimativa de perda de 10% e um erro aceitável de 0,7 unidades em um estudo de não-inferioridade, o tamanho amostral necessário foi de 10 amostras em cada grupo (N=30).

Doze (12) pacientes do sexo feminino atendidas no Serviço de Mastologia, apresentando indicação de reconstrução mamária com emprego da lipoenxertia pela técnica de Coleman^(2,3), foram incluídas consecutivamente neste estudo, após leitura e assinatura de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do HCPA – Anexo 2. A cirurgia indicada para cada paciente não foi influenciada ou modificada em virtude de sua inclusão no estudo. Assim como, a inclusão no estudo não acrescentou risco ou prejuízo às pacientes. Foi realizada a coleta de dados a partir do prontuário eletrônico – HCPA referentes à idade, peso, índice de massa corporal (IMC), comorbidades, tabagismo, história pessoal e familiar de câncer de mama, cirurgias prévias, diagnóstico e causa

da cirurgia inicial, estadiamento, tipo de cirurgia, realização de tratamentos complementares (quimioterapia, hormonioterapia e radioterapia), complicações maiores (necessidade de nova intervenção), indicação da lipoenxertia, número total de lipoenxertias e volume enxertado por procedimento, por fim, exames de imagem para seguimento da mama.

Obtenção do enxerto de gordura

A obtenção do enxerto de gordura e lipoenxertia, no Serviço de Mastologia - HCPA, está baseada na técnica descrita por Coleman em 1995⁽²⁾. A gordura é obtida por aspiração manual a partir do tecido subcutâneo, em especial, da região abdominal inferior usando-se uma seringa de 60cc conectada a uma cânula de aspiração de 3,0mm a 5,0mm de diâmetro e 15cm a 23cm de comprimento. O material é transferido para seringas de 10ml e centrifugado a 3000 rpm durante 3 minutos, permitindo a separação das frações oleosa (porção superior), hemática (porção inferior) e gordurosa (central). A fração gordurosa, composta predominantemente de células adiposas viáveis, após a remoção das outras duas frações, foi utilizada neste estudo. A coleta da amostra de cada paciente foi realizada durante o procedimento de reconstrução mamária com lipoenxertia, sendo reservada para o estudo 30ml da fração gordurosa obtida após a centrifugação do lipoaspirado, prevendo possíveis perdas durante os procedimentos em laboratório.

As amostras de 30ml de cada paciente (N = 12), constituídas pela fração de gordura após centrifugação do material lipoaspirado, conforme a técnica de Coleman, serão divididas para análise em 3 grupos descritos a seguir:

- Grupo 1 (grupo “controle” – N=12) – Tecido adiposo fresco não criopreservado: 2mL da fração de tecido adiposo fresco de cada paciente foi colocado em formalina tamponada 10% imediatamente após sua coleta e outro 1mL de tecido adiposo fresco preparado para contagem de células viáveis.
- Grupo 2 (N=12) – Tecido adiposo criopreservado com DMSO 0,5M e trealose 0,2M: 10mL da fração de gordura de cada paciente foi dividido em frações menores de 1mL, e submetido ao procedimento de criopreservação com solução contendo a combinação dos dois ACPs (DMSO 0,5M e trealose 0,2M) em volume de 1:1 (solução e tecido adiposo).

- Grupo 3 (N=11) – Tecido adiposo criopreservado com trealose 0,35M: 10mL da fração de gordura de cada paciente foi dividido em frações menores de 1mL, e submetido ao procedimento de criopreservação com solução contendo apenas trealose 0,35M, em volume de 1:1 (solução e tecido adiposo).

A qualidade do tecido adiposo fresco (Grupo 1) e do tecido adiposo após sua criopreservação (Grupo 2 e Grupo 3) foi analisada através dos procedimentos: contagem de células adipócitas viáveis (1ml de cada amostra), análise com glicerol-3-fosfato desidrogenase (G3PDH) (2ml de cada amostra) e histologia (2ml de cada amostra).

O projeto foi dividido em dois momentos: Experimento 1 e 2. No Experimento 1, os resultados dos procedimentos de análise de qualidade do tecido adiposo lipoaspirado (contagem de células adipócitas viáveis, histologia) das amostras do Grupo 1 (“controle” – tecido adiposo fresco) foram comparados aos resultados de parte das amostras do Grupo 2 e do Grupo 3, descongeladas após estabilizadas em N2 líquido por 20 minutos a -196°C. No Experimento 2, os resultados das análises dos procedimentos de qualidade do tecido adiposo lipoaspirado (contagem de células adipócitas viáveis, histologia e análise com G3PDH) das amostras do Grupo 2 e do Grupo 3 (tecido adiposo criopreservado), após tempo médio de 6 meses de armazenamento em N2 líquido a -196°C, foram novamente comparados com os resultados do Grupo 1 (“controle” – tecido adiposo fresco) e comparados entre os dois diferentes tempos de criopreservação.

Procedimento de criopreservação

Neste estudo, foram utilizados dois ACPs: o dimetilsulfóxido (DMSO) e a trealose^(4,5). Após a coleta do tecido adiposo conforme a técnica de Coleman, a amostra de tecido da paciente foi dividida em uma parte menor (3mL) para análise do tecido fresco e outros 20mL divididos em porções de 1mL em cada criotubo (10mL para o Grupo 2 e 10mL para o Grupo 3). Foram preparadas duas soluções de 10mL de PBS contendo a combinação dos ACPs DMSO 0,5M (3,3%) e trealose 0,2M (7,6%)^(1,4) e outra solução de 10mL de PBS contendo apenas trealose 0,35M⁽⁷⁵⁾ como descrito a seguir:

- DMSO 0,5M + Trealose 0,2M (volume final 10mL): 1,95mL de DMSO 1M em 5mL de PBS + 756mg de Trealose 0,4M em 5mL de PBS (Grupo 2).

- Trealose 0,35M (volume final 10mL): 1324mg em 10mL de PBS (Grupo 3).

Após, 1mL de cada solução de ACPs, conforme preparo acima descrito, foi adicionado a cada criotubo contendo 1mL de tecido adiposo, em uma proporção de 1:1 (Grupo 2 e 3), sendo mantidos em temperatura ambiente por 10 minutos, seguindo para uma etapa de resfriamento lento de, aproximadamente, 22°C até -30°C por 1 hora através do uso de recipiente próprio para congelamento gradual (Thermo Scientific™ Mr. Frosty™), contendo álcool isopropílico que, quando colocado no freezer a -80°C, permite uma taxa de congelamento lenta e constante de -1°C por minuto, adequada para preservação celular, evitando a formação de cristais de gelo⁽⁵⁾. Na sequência, as amostras foram transferidas para o N2 líquido a -196°C. Parte das amostras criopreservadas foram descongeladas, uma vez estabilizadas em N2 líquido por 20 minutos, o que já é considerado, conforme a literatura, o estado permanente deste tecido criopreservado, equivalente à condição de preservação por um longo período, sem mudanças estruturais, uma vez que, nesta temperatura, há uma inatividade de reações químicas (“células adormecidas”)⁽⁶⁾. Outra parte das amostras foram descongeladas em média 6 meses após a criopreservação.

No processo de descongelamento, os criotubos contendo as amostras de tecido adiposo criopreservado (Grupos 2 e 3) foram retirados do N2 líquido e mantidos em temperatura ambiente por 2 minutos para a vaporização do N2 líquido. Após, os criotubos foram colocados em banho-maria a 37°C durante 5 minutos, completando o descongelamento. A seguir, as amostras foram centrifugadas a 2000 rpm durante 2 min com a separação e retirada dos ACPs (camada inferior).

As amostras de cada paciente de tecido adiposo frescas e criopreservadas, após o descongelamento, nos Grupos 1, 2 e 3, foram analisadas através dos procedimentos anteriormente citados:

- Tecido adiposo fresco (Grupo 1) e tecido adiposo criopreservado (Grupos 2 e 3) pelo período de 20 min - contagem de células adipócitas viáveis (1mL de cada amostra) e histologia (2mL de cada amostra).
- Tecido adiposo criopreservado (Grupos 2 e 3) pelo período médio de 6 meses - contagem de células adipócitas viáveis (1mL de cada amostra), histologia (2mL de cada amostra) e análise com G3PDH (2mL de cada amostra).

Avaliação do tecido adiposo criopreservado e fresco

Contagem de células adipócitas viáveis:

A cada 1mL de tecido adiposo fresco (Grupo 1 – “controle”) e 1mL de tecido adiposo descongelado após criopreservação (Grupos 2 e 3) foi adicionado 1mL de colagenase tipo I (Sigma, St. Louis, MO) na concentração de 1mg/ml em solução de fosfato tamponado (PBS) contendo 5% de albumina sérica bovina (Sigma, St. Louis, MO) para digestão, sendo cada mistura incubada a 37°C por 1 hora com velocidade de agitação de 85 rpm. Após 1 hora de incubação, a digestão foi interrompida com a adição de 3mL de meio de cultura contendo 20% de soro fetal bovino.

O tecido adiposo remanescente foi centrifugado a 1100 rpm durante 10 min, sendo fracionado em adipócitos maduros (camada superior - sobrenadante) e aglomerados do estroma (camada inferior). A partir da análise desta camada superior, os adipócitos viáveis foram determinados por meio de contagem utilizando o azul de Trypan 0,4% (Sigma, St. Louis, MO), a partir da diluição de 1:1 (100µL da amostra com 100µL de azul de trypan). O número de adipócitos viáveis foi contado utilizando o hemocitômetro de Neubauer com auxílio de microscópio invertido com magnificação de 200x - 400x.

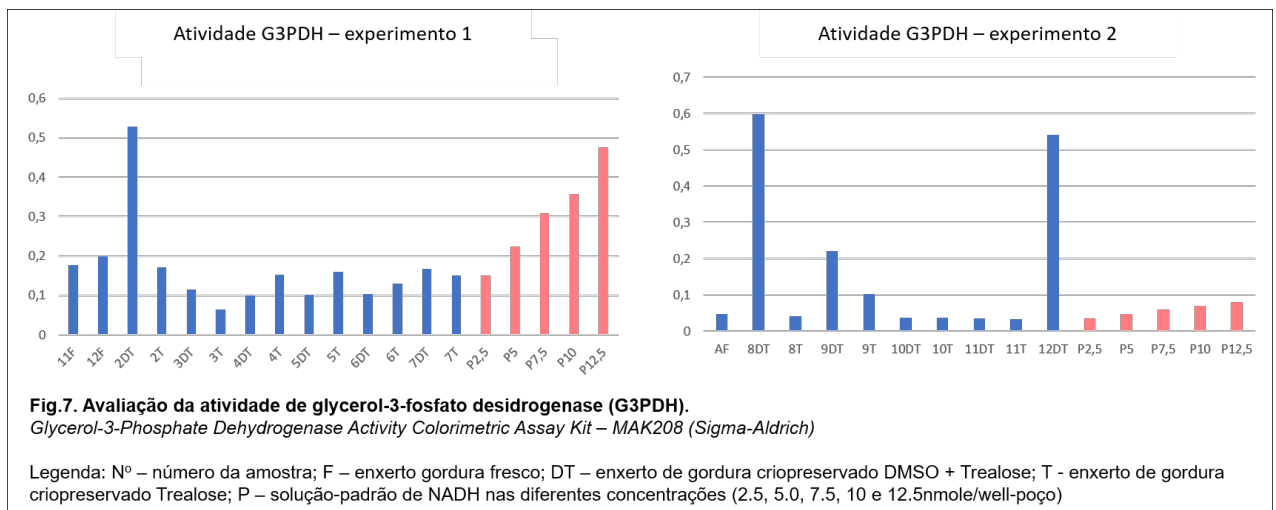
Análise através da glicerol-3-fosfato desidrogenase (G3PDH):

A G3PDH é importante para o metabolismo dos carboidratos e lipídios. Esta enzima catalisa a conversão reversível de diidroxiacetona fosfato e nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH) em glicerol-3-fosfato e dinucleótido de nicotinamida e adenina (NAD⁺). A atividade de G3PDH foi utilizada para avaliar a preservação da função celular do tecido adiposo criopreservado. O ensaio colorimétrico da atividade enzimática, *Glycerol 3-Phosphate Dehydrogenase Activity Colorimetric Assay Kit* (Sigma-Aldrich – MAK208)⁽⁷⁾, permite determinar a atividade de G3PDH em diferentes tecidos e células através da medida por colorimetria da concentração de NADH produzida em 50 µL de cada amostra, em dois diferentes tempos de avaliação (0 min e 60 min), com uso de espectrofotômetro capaz de medir a absorbância em 450 nm (A450), sendo esta medida proporcional a atividade enzimática presente (1 unidade de GPDH é a quantidade de enzima necessária para gerar 1.0 µmol de NADH/minuto em pH 8 a 37°C). Quanto maiores os níveis da enzima, melhor a função celular. A

concentração de glicerol-3-fosfato, intermediário da via metabólica da glicólise e importante nas trocas entre citosol e matriz mitocondrial (lançadeira do G3P), foi calculada com base nos valores de absorbância obtidos pela curva.

Todas as amostras e *NADH Standards* foram avaliadas em duplicata, preparadas conforme protocolo definido pelo produto Sigma-Aldrich – MAK208, disponível em www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/mak208. A solução de *NADH Standards* foi preparada em diferentes concentrações, gerando uma curva-padrão 0 (branco), 2.5, 5, 7.5, 10 e 12.5 nmole/poço (*well*).

Figura 7. Avaliação da atividade de glicerol-3-fosfato desidrogenase (G3PDH): Apresentação das amostras e valores obtidos com a curva relativa a cada experimento – Atividade G3PDH.



Histologia:

Em torno de 2mL tecido adiposo fresco (Grupo 1 – “controle”) e 2mL de tecido adiposo descongelado após criopreservação dos Grupos 2 e 3 de cada paciente foram fixados em formalina tamponada a 10%, embebidos em parafina, seccionados a 5µm de espessura e corados com hematoxilina-eosina (HE). Todas as lâminas foram avaliadas por patologista experiente e cegado quanto ao grupo a que cada amostra pertencia (Grupo 1, Grupo 2, Grupo 3) e ao tempo de criopreservação. Foram analisadas alterações celulares, teciduais arquiteturais, como degeneração adiposa e necrose, e alterações inflamatórias, conforme escore descrito a seguir, modificado a partir de escala previamente relatada por Shoshani e Ullmann (2005)⁽⁸⁾, onde cada

parâmetro recebe uma graduação por uma escala semi-quantitativa conforme sua presença na avaliação histológicas das lâminas HE. Foram incluídos dois parâmetros histológicos (células adiposas não agrupadas/organizadas em lóbulos, *shrinkage*) e modificada a escala de graduação para tornar mais objetiva a classificação a partir do escore original (graduação reduzida de 0 a 5 para 0 a 3)⁽⁸⁾:

- a. Células adiposas não intactas e não nucleadas
- b. *Shrinkage* (“encolhimento” da célula)
- c. Células adiposas não agrupadas/organizadas em lóbulos
- d. Pseudocistos/vacúolos extracelulares
- e. Fibrose e outros componentes do tecido conectivo
- f. Alterações inflamatórias (evidenciada pela infiltração de linfócitos e macrófagos)

Parâmetro	Contagem %	Escore: 0-3
Células adiposas não intactas e não nucleadas		
<i>Shrinkage</i>		
Células adiposas não agrupadas/organizadas em lóbulos		
Pseudocistos/vacúolos extracelulares		
Fibrose e outros componentes do tecido conectivo		
Alterações inflamatórias		

Escore modificado:

0 – ausente; 1 – discreta; 2 – moderada; 3 – acentuada

Quanto maior o valor do escore total, maiores foram as alterações identificadas na amostra de tecido adiposo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Pu LL, Coleman SR, Cui X, et al. Cryopreservation of autologous fat crafts harvest with the Coleman technique. *Ann Plast Surg*. 2010;64:333-337.
2. Coleman SR. Long-term survival of fat transplants: controlled demonstrations. *Aesthetic Plast Surg* 1995;19:421–425.
3. Coleman SR, Saboeiro AP. Fat grafting to the breast revisited: safety and efficacy. *Plast Reconstr Surg* 2007;119:775-785.
4. Pu LL, Cui X, Fink BF, et al. Long-term preservation of adipose aspirates after conventional lipoplasty. *Aesthet Surg J* 2004;24:536-541.
5. Pegg DE. The history and principles of cryopreservation. *Semin Reprod Med* 2002;20:5-13.
6. Gao DY, Critser JK. Mechanisms of cryoinjury in living cells. *Inst Lab Anim Resour J*. 2000;41:187-196.
7. Glycerol 3-Phosphate Dehydrogenase Activity Colorimetric Assay Kit (Sigma-Aldrich – MAK208) www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/mak208.
8. Shoshani O, Livne E, Armoni M, et al. The effect of interleukin-8 on the viability of injected adipose tissue in nude mice. *Plast Reconstr Surg* 2005;115:853.

ANEXO 2

MATERIAL E MÉTODO – Protocolo

Fonte financiadora

O projeto foi financiado pelo Fundo de Incentivo à Pesquisa (FIPE) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), conforme orçamento previamente aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa (CEP)-HCPA.

ANEXO 3

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

Rubrica do participante _____ Rubrica do pesquisador _____

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

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.

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

Rubrica do participante _____ Rubrica do pesquisador _____

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.

() 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.

Rubrica do participante _____ Rubrica do pesquisador _____

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 _____

ANEXO 4

TCUMBio - Termo de Compromisso para Utilização de Material Biológico e Informações Associadas



Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação

Termo de Compromisso para Utilização de Material Biológico e Informações Associadas

Título do Projeto

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

Os pesquisadores do presente projeto se comprometem a preservar a privacidade dos pacientes cujos materiais biológicos estão mantidos em biorepositórios, bem como de suas respectivas informações associadas, contidas em prontuários e bases de dados do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Concordam, igualmente, que estas informações serão utilizadas única e exclusivamente para execução do presente projeto. As informações somente poderão ser divulgadas de forma anônima.

Porto Alegre, 18 de junho de 2015.

Nome dos Pesquisadores	Assinatura
Márcia Portela de Melo	<i>Márcia Portela de Melo</i>
Prof. Dra. Maria Isabel Edelweiss	<i>M. Edelweiss</i>
Prof. Dr. Edison Capp	<i>Edison Capp</i>
Prof. Dr. Jorge Villanova Biazús	<i>Jorge Villanova Biazús</i>
Profa. Dra. Ilma Simoni Brum	<i>Ilma Simoni Brum</i>
Dr. Diego de Mendonça Uchôa	<i>Diego de Mendonça Uchôa</i>

ANEXO 5

FICHAS DE COLETAS DE DADOS E ANÁLISES

1. FICHA - COLETA DE DADOS CLÍNICOS/CIRÚRGICOS:

Prontuário: _____ Número Amostra: _____

Data coleta: _____

Data Nascimento: _____

Fone: _____

Procedente: _____

Carcinoma de mama: sim ___ não ___

Tipo histol.: CDI ___ CLI ___ Misto ___ CDIS ___

Estadiamento: _____ IHQ: _____

Cirurgia inicial por câncer de mama: sim ___ não ___

Lado Esquerdo ___ Direito ___ Bilateral _____

Outras causas para cirurgia inicial: _____

Tipo de cirurgia: _____

Lateralidade: Esquerdo ___ Direito ___ Bilateral _____

Complicações: _____

Sem Quimioterapia ___ Quimioterapia adjuvante ___

Quimioterapia neoadjuvante _____

Hormonioterapia: sim ___ não ___

Radioterapia: sim ___ não ___

Comorbidades: _____

Peso: _____ Altura: _____ IMC: _____

Lipoenxertia – indicação: _____

Lateralidade: Esquerda ___ Direita ___ Bilateral _____

Número total de procedimentos de lipoenxertia: _____

Data _____ Volume _____

Data _____ Volume _____

Data _____ Volume _____

Data _____ Volume _____

ANEXO 5

FICHAS DE COLETAS DE DADOS E ANÁLISES

2. FICHA – CONTAGEM CÉLULAS ADIPOSAS VIÁVEIS: AZUL TRYPAN

 Experimento:

Paciente _____

Contagem de células adipócitas viáveis com azul de Trypan 0,4%:

Câmara de Neubauer:

a. Gordura Fresca

Soma total = _____ /8 = _____

_____ x 2* = _____ x 10⁴ céls/ml de solução

b. Gordura Criopreservada DMSO + Trealose

Soma total = _____ /8 = _____

_____ x 2* = _____ x 10⁴ céls/ml de solução

c. Gordura Criopreservada Trealose

Soma total = _____ /8 = _____

_____ x 2* = _____ x 10⁴ céls/ml de solução

OBS.: * a média da soma é multiplicada por 2 devido a diluição do corante

ANEXO 5**FICHAS DE COLETAS DE DADOS E ANÁLISES****3. FICHA – AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA (HE) – TECIDO ADIPOSEO**

Nome da Amostra – Identificação da Lâmina: _____

FICHA DE APOIO**A. AVALIAÇÃO DA CÉLULAS ADIPOSAS:**

Parâmetros para análise

1. forma celular esférica ou poligonal/poliédrica mantida
2. células com aspecto “vazio” pela gordura dissolvida no interior da vesícula única, ocupando quase a totalidade da célula
3. halo fino de citoplasma ao redor
4. núcleo presente na periferia da célula
5. presença de necrose
6. número absoluto de células presentes por campo de 400 vezes (**média de 3 campos**) _____

presença de degeneração ou necrose adiposa

B. AVALIAÇÃO ARQUITETURAL DO TECIDO ADIPOSEO:

Parâmetros para análise

1. células adiposas agrupadas/organizadas em lobos ou lóbulos separados por septos de tecido conectivo de densidade variável (matriz extracelular)
2. presença de pseudocistos e vacúolos extracelulares
3. presença de fibrose e outros componentes do tecido conectivo (isto é, fibras de colágeno)

preservação global da arquitetura tecidual

classificação conforme o processo patológico - _____

C. PRESENÇA DE OUTRAS ALTERAÇÕES:

Parâmetros para análise

1. presença de monócitos, macrófagos e linfócitos (alterações inflamatórias)
2. presença anômala de outras células (ou de outros componentes do tecido conectivo) - fibroblastos, células musculares lisas vasculares, células endoteliais

ausência de inflamação

presença de inflamação ou alguma outra alteração - _____

3. FICHA – AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA (HE) – TECIDO ADIPOSEO

Parâmetros *Shoshani e Ullmann* – MODIFICADO:

- a. Células adiposas não intactas e não nucleadas
- b. *Shrinkage* (“encolhimento” da célula)
- c. Células adiposas não agrupadas/organizadas em lóbulos
- d. Pseudocistos/vacúolos extracelulares
- e. Fibrose e outros componentes do tecido conectivo
- f. Alterações inflamatórias (evidenciada pela infiltração de linfócitos e macrófagos)

Parâmetro	Contagem %	Escore: 0-3
Células adiposas não intactas e não nucleadas		
<i>Shrinkage</i>		
Células adiposas não agrupadas/organizadas em lóbulos		
Pseudocistos/vacúolos extracelulares		
Fibrose e outros componentes do tecido conectivo		
Alterações inflamatórias		

Escore modificado:

- 0 – ausente
- 1 – discreta
- 2 – moderada
- 3 – acentuada

- Quanto maior o valor do escore, mais distante do usual a avaliação tecidual e celular^(Shoshani et al. 2005).