

Células-tronco derivadas de tecido adiposo: isolamento, cultivo *in vitro* e perspectivas de utilização em dermatologia

Adipose tissue derived stem cells: isolation, in vitro culture and potential uses in dermatology

RESUMO

É extensa a literatura existente sobre as características e potenciais terapêuticos das células-tronco mesenquimais adultas, e a possibilidade de seu isolamento a partir de tecido adiposo excedente de outros procedimentos é promissora e extremamente desejável. Os protocolos para tal utilização, porém, ainda são descritos de maneira sumarizada e não padronizada. O objetivo dessa comunicação é apresentar um protocolo simples, prático e eficaz tanto da coleta do tecido adiposo em ambiente hospitalar quanto do isolamento e cultivo, em laboratório, *in vitro* de células-tronco mesenquimais adultas derivadas de tecido adiposo, com a finalidade de discutir as perspectivas da utilização dessa técnica na dermatologia.

Palavras-chave: células-tronco adultas; dermatologia; células-tronco; tecido adiposo; terapia celular.

ABSTRACT

There are extensive reports on the characteristics and therapeutic potential of adult mesenchymal stem cells. The possibility of isolating them from excess adipose tissue obtained from other procedures is promising and extremely desirable. However, the protocols for such applications are still described in a summarized, rather than standardized, manner. Thus, the objective of this paper is to present a simple, practical and effective protocol for the collection of adipose tissue in the hospital environment, and for the isolation and in vitro cultivation of adult mesenchymal stem cells obtained from adipose tissue in a laboratory, with the purpose of discussing the potential uses of this technique in the field of dermatology.

Keywords: adult stem cells; dermatology; stem cells; adipose tissue ; tissue therapy.

INTRODUÇÃO

A inovação científica e o potencial terapêutico trazidos pelas células-tronco derivadas de tecidos adultos às áreas médica e científica têm sido reportados há anos. Tais células (células-tronco adultas ou ASCs, do inglês *adult stem cells*), parecem estar envolvidas na renovação natural de tecidos.^{1,2} Esse potencial terapêutico baseia-se em algumas propriedades intrínsecas, como, por exemplo, a clonogenicidade – habilidade de perceber a baixa densidade das células e ativar sua capacidade de duplicação –, a multipotencialidade – potencial de dar origem a um maior número de células mais especializadas; e a capacidade de autorrenovação, dando origem a novas células multipotentes.³⁻⁷ Em 1999, tais características foram sumarizadas e ressaltadas em um editorial da revista *Science*,⁸ e desde então, o interesse no estudo dessas células vem crescendo continuamente

Artigo de Revisão

Autores:

Vania M. F. Yokomizo¹
Tania M. H. Benemond¹
Fabiana F. Bressan²
Juliano R. Sangalli²
Naira C. G. Pieiri³
Juliana B. Casals³
Daniele S. Martins⁴
Flávio V. Meirelles⁴

¹ Dermatologista colaboradora do Serviço de Dermatologia do Hospital do Servidor Público Municipal de São Paulo – São Paulo (SP), Brasil.

² Pós-graduando(a) do Departamento de Ciências Básicas da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo (USP) – São Paulo (SP), Brasil.

³ Pós-graduando do Departamento de Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo (USP) – São Paulo (SP), Brasil.

⁴ Docente da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo (USP) – São Paulo (SP), Brasil.

Correspondência para:

Dra. Vania M. F. Yokomizo
Cedem
Rua Castro Alves, 60, 5º andar - sala 52
01532-000 - São Paulo - SP
Tel: +55 11 3816 3137
E-mail: vaniamfy@yahoo.com.br

Recebido em: 10/12/2010

Aprovado em: 10/01/2011

Trabalho realizado no Serviço de Dermatologia do Hospital do Servidor Público Municipal de São Paulo em conjunto com o Laboratório de Morfofisiologia Molecular e Desenvolvimento do Departamento de Ciências Básicas da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo (USP) – São Paulo (SP), Brasil.

Conflito de interesse: Nenhum
Suporte financeiro: Nenhum

na comunidade científica, uma vez que suas potenciais aplicações na engenharia de tecidos e terapia genética são enormes.⁹

Estudos relacionados à terapia celular são cada vez mais frequentes e revelam terapias potenciais para a medicina regenerativa, que se dedica ao tratamento de lesões e doenças e para a possível substituição ou proteção de células e tecidos lesados ou perdidos, objetivando restaurar suas funções.¹⁰

Propõe-se atualmente que a terapia celular com células mesenquimais adultas apresente vantagens em relação a outros métodos na reparação de tecidos, resultando em regeneração de alta qualidade sem a formação de cicatrizes ou fibrose. Além do mais, por ser transplante autólogo apresenta baixíssimo risco de rejeição e transmissão de doenças em comparação a outras possíveis fontes de células-tronco exógenas, tais como as embrionárias.^{3, 4, 10-15}

Estudos realizados por Meirelles e Nardi,¹⁶ Haynesworth et al.,¹⁷ Majumdar et al.,¹⁸ Romanov et al.¹⁹ e Campagnoli et al.²⁰ demonstraram que as células-tronco mesenquimais (CTMs) isoladas da medula óssea apresentam características que permitem sua classificação de forma operacional e são capazes de se autorrenovar, podendo diferenciar-se em várias linhagens de tecido conjuntivo, ósseo, adiposo e muscular.

Meirelles et al.⁵ mostraram que células com características de CTMs podem ser derivadas e propagadas *in vitro* a partir de diferentes órgãos e tecidos, como cérebro, baço, fígado, rim, pulmão, medula óssea, músculo, timo e pâncreas. No tecido adiposo, a presença de tais células já havia sido reportada por Zuk et al.,²¹ que realizaram estudos comprovando a existência de células-tronco no tecido adiposo humano e compararam o potencial de diferenciação dessas células com o das CTMs isoladas da medula. Esse trabalho provado que as células-tronco provenientes do tecido adiposo são semelhantes às células-tronco obtidas da medula óssea.²²

Já se demonstrou que a população de células-tronco derivadas de tecido adiposo digerido com colagenase, também chamada de fração vascular estromal, é capaz de se diferenciar em diversas linhagens celulares, incluindo tecido adiposo, cartilagem, osso, musculatura esquelética, células neuronais, células endoteliais, cardiomiócitos e células do tecido muscular liso.^{3,19, 20,23-27} O tecido adiposo representa a fonte ideal de células-tronco autólogas, uma vez que sua obtenção é fácil, com mínimo desconforto para o paciente e, muitas vezes, com capacidade proliferativa maior do que a das células derivadas da medula óssea. Tal característica pode ser intrínseca às células ou então resultado de maior densidade de células-tronco na população inicial. Dessa forma, existe menor invasividade e complexidade na coleta, o que resulta em menor sofrimento para o paciente, associadas à possibilidade de recuperar números expressivos de células mesenquimais, suficientes para evitar expansão extensiva em cultivo, geram efetivo potencial clínico das células derivadas de tecido adiposo, em relação a outras metodologias.

Dessa maneira, o tecido adiposo tornou-se para a medicina cirúrgica e regenerativa muito atraente fonte de CTMs para procedimentos de terapias celulares, principalmente na

dermatologia cirúrgica e cosmética, pois podem ser obtidas em grandes quantidades em cirurgias de lipoaspiração, a partir de material que antes seria descartado.²⁸ Desse modo, este artigo tem como objetivo descrever os procedimentos para a obtenção de material lipoaspirado mediante intervenção cirúrgica, isolamento das células mesenquimais e seu cultivo.

TÉCNICA DE COLETA, ISOLAMENTO E CULTIVO PROTOCOLO SUGERIDO

Coleta do tecido adiposo

Utiliza-se gordura descartada de cirurgias cosméticas de lipoescultura (lipoaspiração/lipoenxertia) em pacientes do sexo feminino.

O procedimento de coleta do tecido adiposo se inicia com o estudo cuidadoso do local a ser manipulado. Realizam-se fotodocumentação prévia e marcação de áreas doadoras. Na prática, as áreas mais utilizadas como doadoras são as regiões supratrocantéricas, flancos e abdome; porém, segundo Jurgens et al.²⁹ e Almeida et al.³⁰, as áreas doadoras preferidas para obtenção de maior rendimento de células da fração vascular estromal estão localizadas no tronco e, em seguida, nos membros.

Para a coleta do lipoaspirado, procede-se à assepsia e antissepsia da região doadora, seguida de anestesia tumescente composta por 180ml de soro fisiológico 0,9%, 10ml de cloridrato de lidocaína 2% sem vasoconstritor, 10ml de solução de bicarbonato de sódio 8,4% e 0,4ml de epinefrina na diluição de 1/1.000.^{31,32}

Após realização de botão anestésico na área doadora com lidocaína 2%, procede-se a pequena incisão com lâmina 11 e introduz-se cânula de lipoaspiração de três milímetros, com três orifícios na extremidade, acoplada a seringas de 10ml.

Aproximadamente 30ml de gordura é aspirada através da técnica manual sob baixa pressão, atraumática. Se necessário, efetua-se fechamento com sutura (ponto simples com fio mononylon 6-0) no local de introdução da cânula, massageando o local previamente para a drenagem de fluidos e sangue.

As seringas contendo o material coletado são lavadas com soro fisiológico estéril duas ou três vezes, seladas e colocadas em decantador por 30min. Posteriormente, procede-se ao descarte do sobrenadante e à obtenção do precipitado (Figura 1).

As seringas com a gordura remanescente são seladas e enviadas ao laboratório para processamento do tecido adiposo.

Digestão do tecido adiposo, isolamento e cultivo das células mesenquimais

Diversos autores têm relatado diferentes técnicas para essa fase do procedimento^{24,26,33}. Rodbell et al.³³ introduziram o método inicial para isolar as células do tecido adiposo em animais de laboratório. Posteriormente o protocolo foi adaptado e utilizado com sucesso em amostras de tecido adiposo humano.^{24,26}

Atualmente, a metodologia mais comumente utilizada para o isolamento das MSCs a partir de lipoaspirados é a publicada por Zuk et al.,²⁴ que descrevem os processos de aspiração do tecido adiposo, digestão do tecido, cultivo e caracterização das

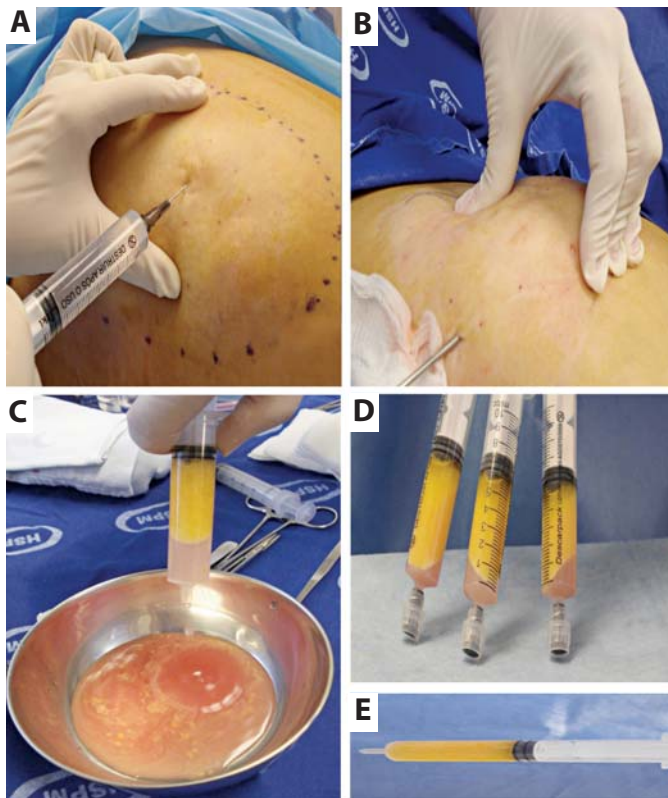


Figura 1: Fotomacroscopia do procedimento de coleta do tecido adiposo através de lipoaspiração; **A.** anestesia tumescente; **B.** coleta do lipoaspirado; **C.** lavagem da gordura com soro fisiológico; **D.** material decantado; **E.** gordura resultante

células mesenquimais. A técnica descrita a seguir é baseada na técnica de Zuk.²⁴

Reagentes utilizados

- Tampão salino fosfato (PBS, do inglês *phosphate buffered saline*)
- Colagenase IV (Sigma[®])
- Meio de cultivo DMEM
- Soro fetal bovino caracterizado (Hyclone[®])
- Sulfato de amicacina (Klebicil, Greenpharma[®])
- Anfotericina B (Invitrogen[®])
- Substituto de tripsina Tryple express (Invitrogen[®])
- Dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma[®])

Instrumental e equipamentos utilizados

- Placas de cultivo de 60mm (TPP[®])
- Tubos cônicos de 15ml e 50ml (TPP[®])
- Pipetas (Eppendorf[®])
- Ponteiras para pipetas (TPP[®])
- Centrifuga (Baby I centrifuge mod.206, Fanem[®])
- Câmara de fluxo laminar (Trox technik[®])
- Incubadora (Forma Scientific[®])
- Microscópio invertido (Leica DM IRB[®])
- Mr. Frosty (Nalgene[®])
- Câmara de Neubauer (Boeco Germany[®])

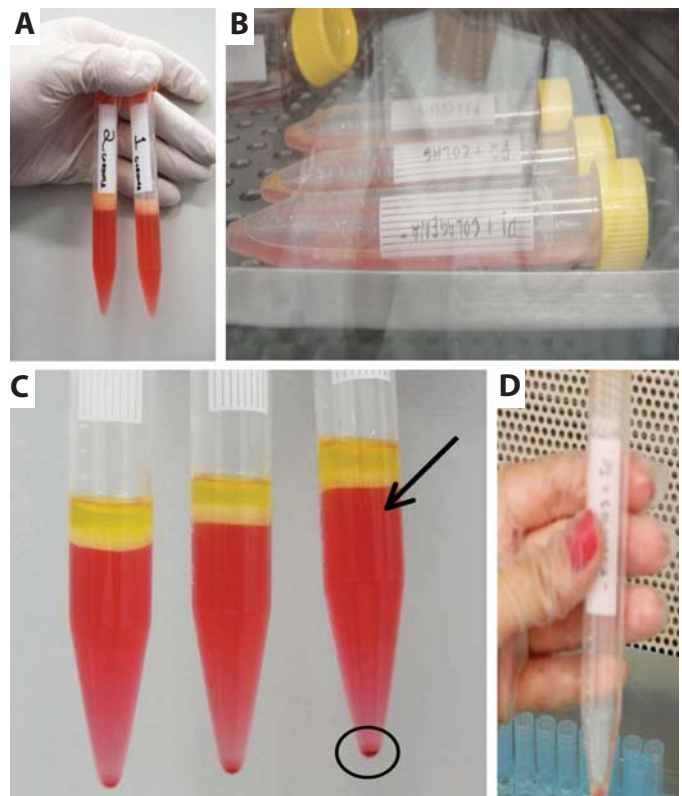


Figura 2: Fotomacroscopia do protocolo do cultivo celular; **A.** lipoaspirado com colagenase para a digestão celular; **B.** digestão celular; as figuras **C** e **D** evidenciam a formação do sobrenadante (seta) e o pellet (círculo) contendo células

Procedimento

Todos os procedimentos laboratoriais são realizados em câmara de fluxo laminar sob condições estéreis (Figura 2). Para a obtenção das CTMs o tecido adiposo lipoaspirado deve passar por sucessivas lavagens em solução de PBS. Após as lavagens, o material é submetido ao processo enzimático de digestão com colagenase (0,010g/ml de colagenase IV) em meio de cultivo DMEM, suplementado com 83,4µg/ml de sulfato de amicacina e 1% de anfotericina B. A solução de colagenase com tecido adiposo deve ser então mantida em incubadora a 37°C com 5% CO₂ por três horas, com umidade controlada.

Após o período de incubação enzimática, a solução resultante é lavada em meio de cultivo suplementado com 10% de soro fetal bovino e antibiótico, centrifugado durante cinco minutos a 300g, e o sobrenadante, descartado (fração adiposa). O precipitado resultante é ressuspenso no meio de cultivo supracitado, sequencialmente semeado em placas de 60mm e mantido em incubadora com temperatura (37°C) e atmosfera de CO₂ controlada (5% em ar).

A partir das primeiras 48 horas, o meio de cultivo é trocado a cada dois dias, mantendo-se as trocas até que as células alcancem a confluência de 70%, quando são então submetidas a repique e plaqueamento. Tais procedimentos incluem a tripsinização celular, que consiste na incubação da placa de

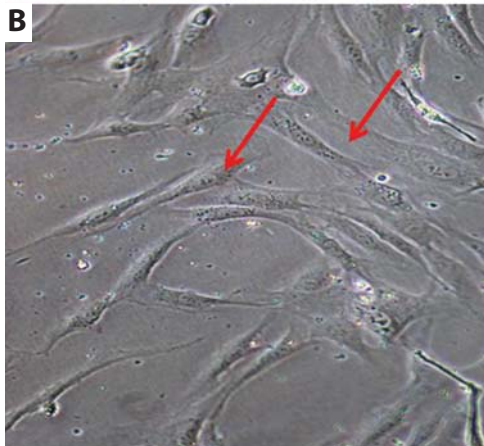


Figura 3: Fotomicroscopia das células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo humano; **A.** células (círculo) com um dia de cultivo; **B.** células após quatro dias de cultivo (seta). Meio: DMEM. Barra: A = 500µm; B = 100µm

cultivo com o substituto da enzima tripsina por aproximadamente dez minutos, e a inativação do processo com meio DMEM suplementado com soro fetal. Nesse momento, as células são transferidas para tubos de centrifuga cônica com capacidade de 15ml e centrifugadas a 300g durante oito minutos; o sobrenadante é descartado; o precipitado, ressuspenso; a concentração, estimada através da Câmara de Neubauer; e as células, replaqueadas. O cultivo *in vitro* deve ser acompanhado e fotodocumentado em microscópio invertido (Figura 3).

O processo de congelamento para a preservação e manutenção do cultivo celular é realizado com a etapa de tripsinização, como já descrito, seguida do congelamento: o sobrenadante formado é retirado, e o precipitado, ressuspenso em meio para congelamento previamente preparado (DMEM suplementado de 10% de SFB, 10% de DMSO e antibióticos)

em concentração de aproximadamente 1×10^6 células/ml e distribuído em criotubos. Os criotubos são alocados em dispositivos próprios para congelamento (Mr. Frosty), que permitem a realização da curva de congelamento de -1°C por minuto, quando submetidos à temperatura de -80°C . O dispositivo contendo os criotubos assim permanece de quatro a 24 horas, quando então são transferidos para o tanque de nitrogênio líquido no qual permanecem armazenados e criopreservados por tempo indeterminado.

PERSPECTIVAS

O envelhecimento cutâneo é um desafio para a medicina. Os cirurgiões plásticos e os dermatologistas são constantemente solicitados a resolver problemas como o preenchimento de rugas e sulcos profundos.

Por essa razão, diversas pesquisas com células mesenquimais provenientes de tecido adiposo lipoaspirado vêm sendo realizadas, não só porque o processo de obtenção é simples em relação às outras fontes, mas principalmente pelos bons resultados de regeneração do local em que essas células foram aplicadas em protocolos de terapia celular.⁶ Alguns ensaios clínicos relatam ainda que há diferenciação das mesmas em células do tecido residente,³⁴ ainda que atualmente se acredite que um possível fator trófico dessas células seja o maior fator de regeneração tecidual pós-injúria.³⁵

Segundo Shiffman e Mirrafati³⁶ o sucesso do procedimento depende diretamente das técnicas de coleta, limpeza e reinjeção do material. Ainda não existe, porém, um protocolo-padrão que defina a melhor maneira de processamento da gordura para enxerto de longo prazo independente da área injetada.³⁷

Recentemente mostrou-se que a associação de CTMs e enxerto de gordura visando ao aumento da mama promove resultados satisfatórios sem complicações importantes,³⁸ pois oferece a possibilidade de preenchimento em longo prazo,³⁹ sendo a sobrevivência dos adipócitos um dos principais fatores que interferem diretamente no sucesso dos enxertos.^{24,27,40}

Segundo Radovan Borojevic⁴¹ a utilização de terapias celulares com células-tronco mesenquimais é prática em ascensão nas cirurgias reparadoras, principalmente de defeitos estéticos, como cicatrizes de acne, ríides e envelhecimento cutâneo, entre outros. É importante ressaltar que terapias nas quais células-tronco são utilizadas para o rejuvenescimento não impedem o processo natural do envelhecimento; a terapia celular, entretanto, poderia torná-lo mais gradual, resultando em melhor qualidade de vida quanto à funcionalidade e estética do organismo humano. ●

REFERÊNCIAS

1. Tarnowski M, Sieron A. Adult stem cells and their ability to differentiate. *Med Sci Monit*. 2006; 12(8): RA154-63.
2. Docheva D, Popov C, Mutschler W, Schieker M. Human mesenchymal stem cells in contact with their environment: surface characteristics and the integrin system. *J Cell Mol Med*. 2007; 11(1): 21-38.
3. Pittenger MF, Mackay AM, Beck AD, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999; 284(5411): 143-7.
4. Bittencourt RAC, Pereira HR, Felisbino SL, Murador P, Oliveira APE, Deffune E. Isolamento de células-tronco mesenquimais da medula óssea. *Acta Ortopédica Brasileira*. 2006; 14(1): 1-6.
5. Silva Meirelles L, Chagastelles PC, Nardi NB. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci*. 2006; 119(Pt 11): 2204-13.
6. ZAMPROGNO H. Aplicabilidade das Células tronco na ortopedia veterinária. . Congresso Brasileiro da Anclivepa, XXVIII., Florianópolis. Anais do XXVIII Congresso Brasileiro da Anclivepa. 2007: 74-6.
7. Claudio-da-Silva C, Baptista LS, Carias RB, C Menezes Neto C, Borojevic R. Autologous mesenchymal stem cells culture from adipose tissue for treatment of facial rhytids. *Rev Col Bras Cir*. 2009; 36(4): 288-91.
8. Vogel G. Breakthrough of the year. Capturing the promise of youth. *Science*. 1999; 286(5448): 2238-9.
9. Pereira, I, Pontes P, Eça L, Ferreira A, Mazzetti P, Silva L, et al. Pilot protocol for separation and quantification of stem cells from fat tissue of rabbits for posterior use in larynx. . ACTA ORL/Técnicas em Otorrinolaringologia. 2008; 26(3): 11-6.
10. Zago MA. Terapia com células tronco: fundamentos, oportunidades e obstáculos. *Revista da sociedade brasileira de hipertensão*. 2005; 8(4): 145-50.
11. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*. 1998; 282(5391): 1145-7.
12. Rosada C, Justesen J, Melsvik D, Ebbesen P, M Kassem M. The human umbilical cord blood: a potential source for osteoblast progenitor cells. *Calcif Tissue Int*. 2003; 72(2): 135-42.
13. Barry FP, Murphy JM. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004; 36(4): 568-84.
14. Csaki C, Matis U, Mobasher A, Ye H, Shakibaei M. Chondrogenesis, osteogenesis and adipogenesis of canine mesenchymal stem cells: a biochemical, morphological and ultrastructural study. *Histochem Cell Biol*. 2007; 128(6): 507-20.
15. Pountos I, Corscadden D, Emery P, Giannoudis PV. Mesenchymal stem cell tissue engineering: techniques for isolation, expansion and application. *Injury*. 2007; 38 (Suppl 4): S23-33.
16. Meirelles LDA Nardi NB, Murine marrow-derived mesenchymal stem cell: isolation, in vitro expansion, and characterization. *Br J Haematol*. 2003; 123(4): 702-11.
17. Haynesworth SE, Baber MA, Caplan AI. Cytokine expression by human marrow-derived mesenchymal progenitor cells in vitro: effects of dexamethasone and IL-1 alpha. *J Cell Physiol*. 1996; 166(3): 585-92.
18. Majumdar MK, Thiede MA, Mosca JD, Moorman M, Gerson SL. Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) and stromal cells. *J Cell Physiol*. 1998; 176(1): 57-66.
19. Romanov YA, Svintsitskaya VA, Smirnov VN. Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cells: candidate MSC-like cells from umbilical cord. *Stem Cells*. 2003; 21(1): 105-10.
20. Campagnoli C, Roberts IA, Kumar S, Bennett PR, Bellantuono I, NM Fisk NM. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. *Blood*. 2001; 98(8): 2396-402.
21. 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(12): 4279-95.
22. Fraser JK, Zhu M, Wulur I, Alfonso Z. Adipose-derived stem cells. *Methods Mol Biol*. 2008; 449: 59-67.
23. Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M, Paolucci E, Stornaiuolo A, Cossu G, et al. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science*. 1998; 279(5356): 1528-30.
24. Zuk PA, M Zhu, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng*. 2001; 7(2): 211-28.
25. Krampera M, Pizzolo G, Aprili G, Franchini M. Mesenchymal stem cells for bone, cartilage, tendon and skeletal muscle repair. *Bone*. 2006; 39(4): 678-83.
26. Bunnell BA, Flaas M, Gagliardi C, Patel B, C Ripoll C. Adipose-derived stem cells: isolation, expansion and differentiation. *Methods*. 2008; 45(2): 115-20.
27. Baptista LS, da Silva KR, Pedrosa CS, Claudio-da-Silva C, Carneiro JR, Aniceto M, et al. Adipose tissue of control and ex-obese patients exhibit differences in blood vessel content and resident mesenchymal stem cell population. *Obes Surg*. 2009; 19(9): 1304-12.
28. Casteilla L, Charriere G, Laharrague P, Cousin B, Planat-Benard V, Pericaud L, et al. Adipose tissue, plastic and reconstructive surgery: come back to sources. *Ann Chir Plast Esthet*. 2004; 49(5): 409-18.
29. Jurgens WJ, Oedayrajsingh-Varma MJ, Helder MN, Zandiehoulabi B, Schouten TE, DJ Kuik DJ, et al. Effect of tissue-harvesting site on yield of stem cells derived from adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Cell Tissue Res*. 2008; 332(3): 415-26.
30. Almeida K, Campa A, Cardoso A, Lima F, E Daud E, Stocchero I. Fração vascular estromal de tecido adiposo: como obter células tronco e seu rendimento de acordo com a topografia das áreas doadoras. *Cir. Plást. Ibero-latinoam*. 2008; 34(1): 71-9.
31. Utiyama Y, Di Chiacchio N, Yokomizo V, Benemond T M, Metelmann U. Estudo retrospectivo de 288 lipoaspirações realizadas no Serviço de Dermatologia do Hospital do Servidor Público Municipal de São Paulo. *An Bras Dermatol*. 2003; 78(4): 435-42.
32. Klein JA: The tumescent technique. Anesthesia and modified liposuction technique. *Dermatol Clin*. 1990; 8: 425-37.
33. Rodbell M. Metabolism of isolated fat cells. V. Preparation of "ghots" and their properties; adenyl cyclase and other enzymes. *J Biol Chem*. 1967; 242: 5744-50.
34. Giordano A, Galderisi U, IR Marino IR. From the laboratory bench to the patient's bedside: an update on clinical trials with mesenchymal stem cells. *J Cell Physiol*. 2007; 211(1): 27-35.
35. Cury CC, Guarita-Souza LC. The cultivated bone marrow-derived mesenchymal stem cells viability analysis after cryopreservation : experimental study in rats. *Biology Studies*. 2007; 29(66): 1691.
36. Shiffman MA, Mirrafati S. Fat transfer techniques: the effect of harvest and transfer methods on adipocyte viability and review of the literature. *Dermatol Surg*. 2001; 27(9): 819-26.
37. Toledo LS, Mauad R. Fat injection: a 20-year revision. *Clin Plast Surg*. 2006; 33(1): 47-53.
38. Yoshimura K, Sato K, Aoi N, Kurita M, Hirohi T, Harii K. Cell-assisted lipotransfer for cosmetic breast augmentation: supportive use of adipose-derived stem/stromal cells. *Aesthetic Plast Surg*. 2008; 32(1): p. 48-55; discussion 56-7.
39. Moseley TA, Zhu M, Hedrick MH. Adipose-derived stem and progenitor cells as fillers in plastic and reconstructive surgery. *Plast Reconstr Surg*. 2006; 118(3 Suppl): 121S-8S.
40. DolskyRL, Newman J, Fetzek JR, Anderson RW. Liposuction. History, techniques, and complications. *Dermatol Clin*. 1987; 5(2): 313-33.
41. Borojevic R, Células-tronco: a pesquisa de células-tronco no Brasil. *Rev. Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*. 2006; IX(36): 4-6.