

Efeitos de diferentes pressões de aspiração do tecido adiposo na obtenção de células-tronco mesenquimais

Effects of different liposuction techniques on the isolation of mesenchymal stem cells

LUIZ ALEXANDRE LORICO
TISSIANI¹

MEIRE AGUENA²

MARIA RITA PASSOS-BUENO³

IVALDO ALONSO⁴

RESUMO

Introdução: O enxerto de gordura nos últimos anos voltou a ter destaque como aliado dos cirurgões plásticos no preenchimento de partes moles, no rejuvenescimento facial volumétrico, nos refinamentos de reconstruções mamárias e por ser rica fonte de células-tronco de comportamento mesenquimal (células-tronco adipoderivadas). Considerando que essas células têm importante papel na angiogênese e na diferenciação adipogênica, com impacto direto na sobrevivência dos enxertos de gordura, determinar parâmetros que otimizem a sua obtenção é imperativo. Nesse contexto, o objetivo deste trabalho é avaliar e comparar dois métodos de obtenção do tecido adiposo da região abdominal quanto ao número de células viáveis presentes na fração vâsculo-estromal e analisar a expressão de marcadores de superfície. **Método:** Foram selecionadas 9 pacientes do sexo feminino submetidas a lipoaspiração. O tecido adiposo foi obtido da região abdominal infraumbilical. Da metade direita foram coletados 20 ml de gordura, empregando-se cânula acoplada a uma seringa, cujo êmbolo foi tracionado de 2 cc em 2 cc, gerando baixas pressões de aspiração (grupo manual). O mesmo processo foi repetido na metade esquerda, entretanto a cânula estava acoplada a um coletor intermediário estéril e esse a uma máquina de vácuo sob pressão negativa constante de 350 mmHg (grupo a vácuo). As amostras foram centrifugadas e a gordura da camada intermediária dos dois grupos foi submetida a contagem celular, estabelecimento de culturas e posterior imunofenotipagem. **Resultados:** Este estudo demonstrou que, apesar de não haver diferença estatisticamente significativa, a obtenção da gordura da região abdominal empregando-se lipoaspirador com pressão negativa de 350 mmHg proporcionou maior número de células presentes na fração vâsculo-estromal quando comparado à obtenção por meio de seringas de 10 ml, com baixas pressões de aspiração. **Conclusões:** O emprego de pressão negativa de 350 mmHg é seguro para a obtenção das células-tronco adipoderivadas e o rendimento celular entre os dois grupos não apresentou diferença estatisticamente significativa.

Descritores: Lipectomia. Imunofenotipagem. Células-tronco. Transplante de células-tronco mesenquimais. Gordura subcutânea abdominal. Medicina regenerativa.

ABSTRACT

Background: In recent years, fat grafts have become useful in plastic surgery. They are mainly used to fill soft tissues, refine breast reconstructions, and for volumetric facial rejuvenation. They are also a rich source of mesenchymal stem cells (i.e., adipose-derived stem cells [ADSCs]), which directly influence fat graft survival. Since ADSCs play an important role in angiogenesis and adipogenic differentiation, it is essential to optimize their isolation. Therefore, in this study, we evaluated and compared 2 procedures used to isolate viable cells from the stromal vascular fraction of abdominal adipose tissue and assess the expressions of surface markers. **Methods:** We examined 9 female subjects who were scheduled to undergo liposuction. The adipose tissue was isolated from the abdominal infraumbilical region. Fat (20 mL) was collected from the right side by using a cannula attached to a syringe; the plunger was pulled back every 2 cm³ to create low-pressure suction (manual group). The same procedure was repeated on the left side, but the cannula was attached to a sterile and intermediate collector coupled to a vacuum pump that provided a constant negative

Trabalho realizado no Hospital Municipal Carmino Caricchio, no Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo e na Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil.

Artigo submetido pelo SGP (Sistema de Gestão de Publicações) da RBCP.

Artigo recebido: 15/7/2012
Artigo aceito: 30/10/2012

1. Cirurgião plástico, doutorando do Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), membro titular da Sociedade Brasileira de Cirurgia Plástica (SBCP), São Paulo, SP, Brasil.
2. Doutora em Ciências Biológicas, bióloga do Genoma Humano, Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, SP, Brasil.
3. Livre-docente, professora titular do Departamento de Genética Evolutiva do Instituto de Biociências da USP, São Paulo, SP, Brasil.
4. Livre-docente, professor associado da FMUSP, cirurgião plástico, membro titular da SBCP, São Paulo, SP, Brasil.

pressure of 350 mmHg (pump group). The samples were centrifuged, and the adipocytes of the intermediate layer were counted, cultured, and immunophenotyped. **Results:** The isolation of abdominal adipocytes with a pump providing a negative pressure of 350 mmHg yielded a higher concentration of cells in the stromal vascular fraction than that obtained using 10-mL syringes and low-pressure suction, although the difference was not significant. **Conclusions:** A negative pressure of 350 mmHg may be safely applied to isolate ADSCs. The cell yield did not indicate any statistically significant difference between the techniques.

Keywords: Lipectomy. Immunophenotyping. Stem cells. Mesenchymal stem cell transplantation. Subcutaneous fat, abdominal. Regenerative medicine.

INTRODUÇÃO

Desde a sua introdução, em 1893, o enxerto de gordura vem sendo utilizado como importante método de preenchimento de partes moles¹. Inicialmente na forma de pequenos e grandes fragmentos^{1,2}, evoluiu para pequenos glóbulos de gordura após o advento da lipoaspiração³. Coleman⁴ desenvolveu técnica que sistematizou a obtenção, o preparo e a introdução do tecido adiposo no leito receptor; objetivando melhor integração dos adipócitos maduros presentes no enxerto e resultados clínicos mais duradouros.

A fisiologia da integração dos enxertos de gordura envolve embebição plasmática inicial, angiogênese, sobrevivência de adipócitos maduros e diferenciação de precursores adipogênicos presentes no enxerto e no leito receptor⁵. Após a identificação do pré-adipócito, em 1926¹, diversos autores, em estudos experimentais, demonstraram a capacidade dos precursores adipocitários de formar tecido adiposo maduro e funcional⁶⁻⁸. Zuk et al.⁹ isolaram na fração vâsculo-estromal do tecido adiposo uma população celular com capacidade de diferenciação pluripotente, semelhante à das células-tronco mesenquimais encontradas na medula óssea. A essas células deu-se o nome de células-tronco adipoderivadas (CTAD).

O tecido adiposo vem sendo utilizado como rica fonte de células-tronco de comportamento mesenquimal, pela aplicação dessas células na engenharia e regeneração de tecidos. Dessa maneira, é necessário desenvolver metodologia de obtenção e preparo que disponibilize o maior número dessas células por grama de tecido adiposo obtido. O objetivo deste trabalho é avaliar e comparar dois métodos de obtenção do tecido adiposo da região abdominal quanto ao número de células viáveis presentes na fração vâsculo-estromal e analisar a expressão de marcadores de superfície.

MÉTODO

Foram selecionadas 9 pacientes do sexo feminino, hígdas, submetidas a lipoaspiração por razões estéticas, sob anestesia geral. As pacientes assinaram Termo de Consentimento Informado, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo.

O tecido adiposo foi obtido da região abdominal infraumbilical. Da metade direita foram coletados 20 ml de gordura, empregando-se cânula de 2,5 mm de diâmetro e 15 cm de comprimento, acoplada a uma seringa com rosca de 10 cc. O êmbolo da seringa foi tracionado de 2 cc em 2 cc, gerando, assim, baixas pressões de aspiração. Esse grupo foi denominado de grupo manual (GM).

Da metade esquerda foram coletados 20 ml de gordura, empregando-se cânula de 3 mm de diâmetro e 25 cm de comprimento, acoplada a um coletor intermediário estéril e esse a uma máquina de vácuo sob pressão negativa constante de 350 mmHg. Esse grupo foi denominado de grupo a vácuo (GV).

Devidamente identificadas, as amostras foram centrifugadas por 3 minutos, sob força centrífuga relativa de 700 g. Após centrifugação, das 3 camadas que se formaram, tanto a superior como a inferior foram descartadas. A gordura das camadas intermediárias provenientes dos dois grupos, GM e GV, foram imediatamente encaminhadas ao Laboratório de Genética do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo e receberam o mesmo tratamento para contagem celular, estabelecimento de culturas e posterior imunofenotipagem.

As amostras de gordura foram submetidas a digestão enzimática com collagenase tipo Ia (Sigma Aldrich), na concentração de 0,5 mg/ml, em banho-maria à temperatura de 37°C, por 30 minutos. A fase líquida, mais densa, foi coletada e a collagenase foi inativada com o meio de Hanks (Gibco, Invitrogen). Essa mistura foi centrifugada por 5 minutos a 500 g, para obtenção do aglomerado celular depositado no fundo do tubo, após descarte do sobrenadante.

Após resuspensão, os aglomerados celulares de cada grupo foram divididos em 4 alíquotas. Uma alíquota foi preparada com azul de Tripán a 0,05%, para a contagem celular automatizada (Countess Automated Cell Counter, Invitrogen). O número final de células foi determinado para cada centímetro cúbico de gordura digerida. Outra alíquota foi criopreservada, para permitir que novas análises pudessem ser realizadas, caso fosse necessário.

Executadas em duplicata, as alíquotas remanescentes foram semeadas em garrafas plásticas de 75 cm², contendo DMEM/F12, MEM NEAA 1%, solução antibiótica de

estreptomicina e penicilina 1% (Gibco, Invitrogen) e soro fetal bovino a 10% (Hyclone). As garrafas foram mantidas em estufa a 37°C, contendo CO₂ a 5%. O meio de cultura foi trocado a cada 3 dias até a obtenção de confluência celular de 85%, quando se estabeleceu a passagem zero (P0).

Nesse momento, as garrafas foram lavadas com solução salina tamponada e as células aderidas ao fundo foram trip-sinizadas (0,125% trypsin, 0,02% EDTA em PBS). Pequenas alíquotas contendo 5 x 10³ células cada, foram preparadas para receber os anticorpos monoclonais IgG contra as proteínas de membrana CD29, CD 31, CD34, CD44, CD45, CD73, CD90 e CD105. A citometria foi realizada utilizando-se o citômetro de fluxo Guava EasyCyte e a análise dos resultados com o programa Guava ExpressPlus (Guava Technologies Hayward, CA, USA).

Com o objetivo de comparar o número de células obtidas nos grupos GM e GV, foi empregado o teste t de Student para amostras pareadas, com nível de significância igual a 5%.

RESULTADOS

O grupo formado por 9 pacientes do sexo feminino, com média de idade de 46,7 anos (variação de 22 anos a 76 anos) e índice de massa corporal (IMC) médio de 24,9 kg/m² (variação de 22 kg/m² a 29,6 kg/m²) apresentou grande variabilidade quanto ao número de células obtidas da fração vaso-estromal do tecido adiposo da região infraumbilical (Tabela 1).

A média do número de células obtidas pelo método manual foi de 1,35 x 10⁶ células, enquanto que no método a vácuo a média foi de 1,77 x 10⁶ células.

Apesar de haver tendência de maior número de células no grupo GV quando comparado ao grupo GM (Figura 1), não houve diferença estatisticamente significativa (P = 0,094).

Tabela 1 – Caracterização das pacientes e número de células presentes na fração vaso-estromal.

Paciente	Sexo	Idade (anos)	IMC (kg/m ²)	Número de células/ml	
				Vácuo	Manual
1	F	55	25,1	580.000	250.000
2	F	45	23,9	6.000.000	4.000.000
3	F	76	29,6	2.900.000	2.300.000
4	F	28	25,7	600.000	350.000
5	F	54	24,1	400.000	300.000
6	F	73	25,9	500.000	1.000.000
7	F	39	24,7	4.000.000	3.700.000
8	F	30	22	1.200.000	500.000
9	F	22	23	190.000	80.000

F = feminino; IMC = índice de massa corporal; M = masculino.

A imunofenotipagem realizada na P0 demonstrou ausência de expressão de marcadores de linhagem endotelial (CD31-) e expressão muito fraca de marcadores de linhagem hematopoiética (CD34+ e CD45+) (Figura 2). Entretanto, os marcadores presentes em populações celulares de origem mesenquimal demonstraram-se fortemente positivos (CD29+, CD44+, CD 73+, CD90+ e CD105+) nas células obtidas da fração vaso-estromal do tecido adiposo da região abdominal em ambos os grupos (Figura 3).

DISCUSSÃO

Analisando-se a história dos enxertos de gordura, dos primórdios aos dias atuais, pode-se encontrar grande variabilidade de resultados na análise em longo prazo. Entretanto, os melhores resultados foram os obtidos por autores que manipularam o tecido adiposo com a preocupação de lesar o menor número possível de adipócitos durante obtenção, preparo e enxertia propriamente dita^{10,11}. Nessa última etapa, permitir adequada nutrição e respiração celulares por meio da embebição plasmática, até que tenha início a neoangiogênese, é fundamental⁵. Como a participação de precursores adipocitários presentes na fração vaso-estromal do

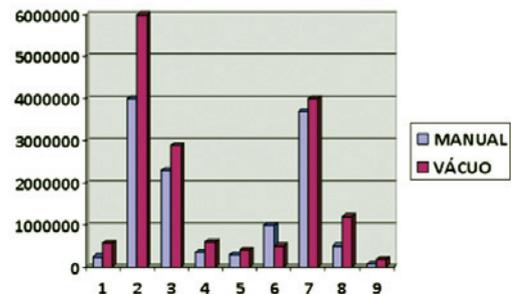


Figura 1 – Rendimento celular nos grupos manual e a vácuo.

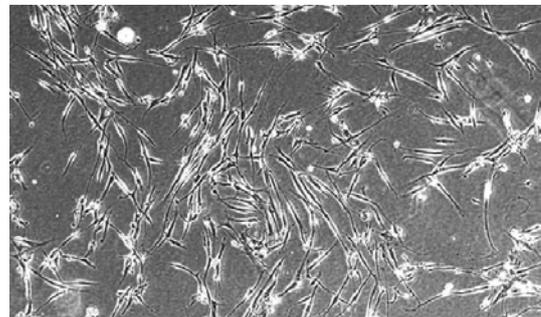
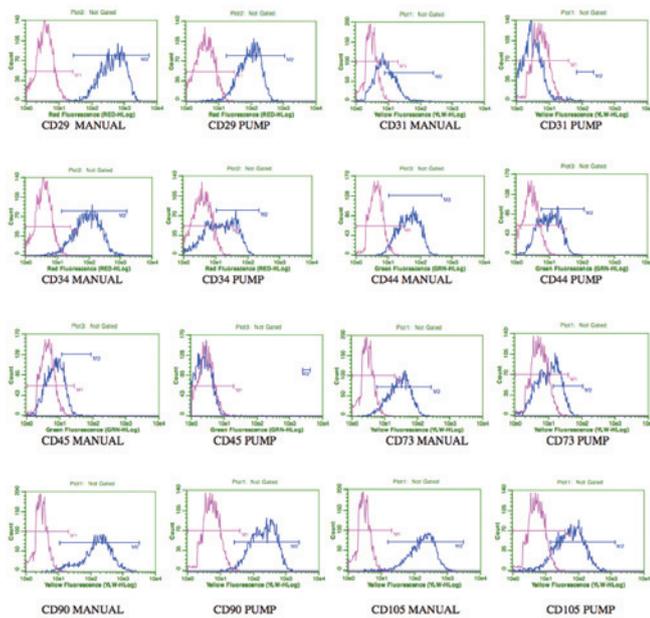


Figura 2 – Células isoladas da fração vaso-estromal do tecido adiposo, em garrafa plástica contendo meio de cultivo de manutenção permitindo a confluência celular. Observa-se que as células apresentam formato alongado, contendo diversos prolongamentos dendríticos.



Marcador	Porcentagem de marcação no grupo manual	Número de eventos	Porcentagem de marcação no grupo a vácuo	Número de eventos
CD29	99,66	5000	97,36	5000
CD31	33,82	5000	—	5000
CD34	96,42	5000	59,90	5000
CD44	95,52	5000	72,88	5000
CD45	24,42	5000	—	5000
CD73	97,14	5000	39,72	5000
CD90	98,30	5000	98,74	5000
CD105	98,16	5000	91,32	5000

Figura 3 – Porcentagem de marcação e número de eventos nos grupos GM e GV com diferentes marcadores. Nos gráficos acima, a linha em magenta representa o controle e a linha em azul representa a expressão dos marcadores de superfície, que se mostrou semelhante nos grupos GM e GV. MANUAL = grupo manual (GM); PUMP = grupo a vácuo (GV).

enxerto de gordura tem importante papel na neovascularização, na diferenciação adipogênica e consequente manutenção volumétrica do enxerto no longo prazo, quanto maior o número dessas células no enxerto, melhor^{12,13}.

A contagem celular demonstrou que, apesar da diferença entre os grupos GM e GV não ter sido significativa, o rendimento de células nucleadas presentes na fração vaso-estromal no grupo GV foi maior. Apesar de não ser um teste de viabilidade celular direto, pois não avalia o metabolismo das células, o ensaio com azul de Tripán cora a membrana das células presentes na fração vaso-estromal

do tecido adiposo, onde se encontram células-tronco de comportamento mesenquimal (CTAD), macrófagos, pericitos, células-tronco hematopoiéticas e endoteliais, pré-adipócitos e fibroblastos, entre outras.

A realização da imunofenotipagem permitiu evidenciar que a pressão negativa não alterou a expressão dos marcadores de superfície na passagem zero (P0), demonstrando que a capacidade de diferenciação adipogênica permaneceu inalterada, assim como o perfil de expressão desses marcadores nessa passagem é semelhante aos encontrados na literatura¹⁴.

Com o objetivo de melhorar a integração dos adipócitos, algumas substâncias foram adicionadas aos enxertos de gordura, tais como interleucina 8¹⁵, plasma rico em plaquetas¹⁶, insulina¹⁷, AMD 3100¹⁸, entre outras. Entretanto, em virtude de resultados paradoxais, permaneceram no campo da biologia experimental. Com a descoberta da pluripotencialidade das CTAD⁹ e do simples processo de obtenção dessas células, Yoshimura et al.¹⁹ desenvolveram os enxertos de gordura enriquecidos com CTAD e os empregaram no tratamento de lipodistrofias faciais e hipomastias²⁰. Esses enxertos de gordura enriquecidos com CTAD também foram empregados em complicações com implantes mamários de silicone²¹. Entretanto, houve grande variabilidade nas taxas de integração desses enxertos.

Ainda não está completamente esclarecido o real papel dos precursores do tecido adiposo presentes nos enxertos de gordura durante o processo de integração dos mesmos, assim como o papel da suplementação desses enxertos com as células provenientes da fração vaso-estromal do tecido adiposo maduro. Considerando a inexistência de estudos prospectivos aleatorizados comparando resultados clínicos de longo prazo de enxertos de gordura com e sem enriquecimento celular, não é possível afirmar, no momento, se o aumento da proporção de CTAD nos enxertos ou se alguma sinalização celular prévia deve ser realizada conjuntamente para obtenção de taxas de integração maiores. Entretanto, o desenvolvimento de métodos que otimizem a obtenção das células da fração vaso-estromal são necessários.

Este estudo corrobora os dados encontrados por Mojallal et al.²² e demonstra que a aspiração manual, empregando-se seringas de 10 cc, com baixas pressões, apresenta menor lise de adipócitos maduros, contudo rende menor número de células presentes na fração vaso-estromal. Agüena et al.²³ demonstraram que a região do abdome abaixo da cicatriz umbilical apresenta maior rendimento de células nucleadas presentes na fração vaso-estromal quando comparado aos flancos; achados que corroboram o trabalho de Jurgens et al.²⁴.

Apesar da grande variabilidade individual, o rendimento celular por centímetro cúbico de gordura mostrou-se compatível com os existentes na literatura²⁵ e, apesar deste estudo não ter realizado ensaios de formação de colônias (CFU-F), o tempo necessário para ocorrer confluência celular

de 85% foi o mesmo em ambos os grupos e este achado denota que a pressão negativa de 350 mmHg não alterou a velocidade de crescimento celular (*doubling time*). Kurita et al.²⁶ demonstraram que forças centrífugas relativas de até 4200 g são seguras para as células nucleadas presentes na fração vâsculo-estromal do tecido adiposo.

Em congruência com os resultados de Mitchell et al.¹⁴, a imunofenotipagem realizada na passagem zero (P0) demonstrou-se homogênea entre as amostras de ambos os grupos (GM e GV) e os anticorpos identificaram marcadores de superfície com padrão de células-tronco de linhagem mesenquimal, o que atesta sua capacidade de diferenciação adipogênica.

CONCLUSÕES

Este estudo permite concluir que o emprego de pressão negativa de 350 mmHg é seguro para a obtenção das células-tronco adipoderivadas e o rendimento celular entre os dois grupos não apresentou diferença estatisticamente significativa. Considerando a possibilidade do uso dessas células, em salas de cirurgia, enriquecendo enxertos de gordura imediatamente após a sua extração, faz-se necessária a realização da imunofenotipagem nas amostras frescas da fração vâsculo-estromal. Futuros estudos deverão ser realizados para se estabelecer qual a melhor taxa de enriquecimento dos enxertos de gordura com as células-tronco adipoderivadas, objetivando-se melhores resultados clínicos no longo prazo.

REFERÊNCIAS

1. Billings E Jr, May JW Jr. Historical review and present status of free fat graft autotransplantation in plastic and reconstructive surgery. *Plast Reconstr Surg*. 1989;83(2):368-81.
2. Ellenbogen R. Fat transfer: current use in practice. *Clin Plast Surg*. 2000;27(4):545-56.
3. Illouz YG. Body contouring by lipolysis: a 5-year experience with over 3000 cases. *Plast Reconstr Surg*. 1983;72(5):591-7.
4. Coleman SR. Facial recontouring with lipostructure. *Clin Plast Surg*. 1997;24(2):347-67.
5. Coleman SR. Structural fat grafting: more than a permanent filler. *Plast Reconstr Surg*. 2006;118(3 suppl.):108S-20S.
6. Hausberger FX. Quantitative studies on the development of autotransplants of immature adipose tissue of rats. *Anat Rec*. 1955;122(4):507-15.
7. Van RL, Roncari DA. Complete differentiation in vivo of implanted cultured adipocyte precursors from adult rats. *Cell Tissue Res*. 1982;225(3):557-66.
8. Rodeheffer MS, Birsoy K, Friedman JM. Identification of white adipocyte progenitor cells in vivo. *Cell*. 2008;135(2):240-9.
9. Zuk PA, Zhu M, 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):221-28.
10. Pu LL, Coleman SR, Cui X, Ferguson RE Jr, Vasconez HC. Autologous fat grafts harvested and refined by the Coleman technique: a comparative study. *Plast Reconstr Surg*. 2008;122(3):932-7.
11. Ramon Y, Shoshani O, Peled IJ, Gilhar A, Carmi N, Fodor L, et al. Enhancing the take of injected adipose tissue by a simple method for concentrating fat cells. *Plast Reconstr Surg*. 2005;115(1):197-201.
12. Planat-Bernard V, Silvestre JS, Cousin B, André M, Nibelink M, Tamarat R, et al. Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives. *Circulation*. 2004;109(5):656-63.
13. Rehman J, Traktuev D, Li J, Merfeld-Clauss S, Temm-Grove CJ, Bovenberk JE, et al. Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. *Circulation*. 2004;109(10):1292-8.
14. Mitchell JB, McIntosh K, Zvonic S, Garrett S, Floyd ZE, Kloster A, et al. Immunophenotype of human adipose-derived cells: temporal changes in stromal-associated and stem cell-associated markers. *Stem Cells*. 2006;24:376-85.
15. Shoshani O, Livne E, Armoni M, Shupak A, Berger J, Ramon Y, et al. The effect of interleukin-8 on the viability of injected adipose tissue in nude mice. *Plast Reconstr Surg*. 2005;115(3):853-9.
16. Salgarello M, Visconti G, Rusciani A. Breast fat grafting with platelet-rich plasma: a comparative clinical study and current state of the art. *Plast Reconstr Surg*. 2011;127(6):2176-85.
17. Lu F, Li J, Gao J, Ogawa R, Ou C, Yang B, et al. Improvement of the survival of human autologous fat transplantation by using VEGF-transfected adipose-derived stem cells. *Plast Reconstr Surg*. 2009;124(5):1437-46.
18. Butala P, Sultan SM, Davidson EH, Crawford JL, Szpalski C, Knobel D, et al. Progenitor cell mobilization augments fat graft survival. *Plast Reconstr Surg*. 2010;126(4):56-7.
19. Yoshimura K, Sato K, Aoi N, Kurita M, Inoue K, Suga H, et al. Cell-assisted lipotransfer for facial lipoatrophy: efficacy of clinical use of adipose-derived stem cells. *Dermatol Surg*. 2008;34(9):1178-85.
20. 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):48-55.
21. Yoshimura K, Asano Y, Aoi N, Kurita M, Oshima Y, Sato K, et al. Progenitor-enriched adipose tissue transplantation as rescue for breast implant complications. *Breast J*. 2010;16(2):169-75.
22. Mojallal A, Auxenfans C, Lequeux C, Braye F, Damour O. Influence of negative pressure when harvesting adipose tissue on cell yield of the stromal-vascular fraction. *Biomed Mater Eng*. 2008;18(4-5):193-7.
23. Aguen M, Fanganiello RD, Tissiani LA, Ishiy FA, Atique R, Alonso N, et al. Optimization of parameters for a more efficient use of adipose-derived stem cells in regenerative medicine therapies. *Stem Cells Int*. 2012;2012:303610.
24. Jurgens WJ, Oedayrajsingh-Varma MJ, Helder MN, Zandiehoulabi B, Schouten TE, 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.
25. Aust L, Devlin B, Foster SJ, Halvorsen YD, Hicok K, du Laney T, et al. Yield of human adipose-derived adult stem cells from liposuction aspirates. *Cytotherapy*. 2004;6(1):7-14.
26. Kurita M, Matsumoto D, Shigeura T, Sato K, Gonda K, Harii K, et al. Influences of centrifugation on cells and tissues in liposuction aspirates: optimized centrifugation for lipotransfer and cell isolation. *Plast Reconstr Surg*. 2008;121(3):1033-41.

Correspondência para:

Nivaldo Alonso
Rua Afonso Braz, 473 – cj. 65 – Vila Nova Conceição – São Paulo, SP, Brasil – CEP 04511-010
E-mail: nivalonso@gmail.com