

Enxerto de Gordura em Coelhos

Américo Marques¹

Elizabeth Brenda²

Paulo Hilário Nascimento Saldiva³

Marco Tullio Junqueira Amarante⁴

Marcus Castro Ferreira⁵

- 1] Prof. Adjunto da Disciplina de Cirurgia Plástica da Escola Paulista de Medicina. Livre docente pela Disciplina de Cirurgia Plástica e Queimaduras da Faculdade de Medicina da USP.
- 2] Pós-graduada em Clínica Cirúrgica pela Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
- 3] Professor Adjunto e Chefe do Laboratório de Poluição Atmosférica Experimental da Faculdade de Medicina da USP.
- 4] "Research Fellow" em Cirurgia Plástica, Medical College of Wisconsin, EUA.
- 5] Professor Titular da Disciplina de Cirurgia Plástica e Queimaduras da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Trabalho desenvolvido na Disciplina de Técnica Operatória e Cirurgia Experimental da EPM e Laboratório de Poluição Atmosférica Experimental da Faculdade de Medicina da USP.

Endereço para Correspondência:

Américo Marques

Av. República do Líbano, 894
São Paulo - SP
04502-001

Unitermos: tecido adiposo; transplante autólogo; cirurgia plástica.

RESUMO

A pesquisa consistiu em analisar o transplante livre de tecido adiposo autólogo, em coelhos, obtido por 5 diferentes modalidades de colheita e preparo, a saber: aspirado, corte, dissecado, tratado e lavado. Nas duas primeiras modalidades, o tecido adiposo autólogo foi colhido por sucção. O aspirado (A) foi colhido com cânula de orifícios de bordas rombas e o corte (C), de bordas afiadas. As três demais modalidades de tecido adiposo foram obtidas por dissecação a céu aberto e fragmentação com tesoura delicada. O tecido assim colhido, fragmentado e injetado chamou-se dissecado (D). O tratado (T) recebeu adição de 2ml de meio de cultura de células 199 com sais de Earle. O lavado (L) foi submetido a lavagem com Ringer-lactato. As áreas doadoras do tecido adiposo foram as bolsas subcutâneas interescapulares. As orelhas dos coelhos foram as receptoras. Os animais foram sacrificados com 7 dias (9 animais), 180 (8 animais) e 360 dias (8 animais). Todas as áreas de transplante foram seccionadas transversalmente a cada 1 cm. A superfície de secção foi medida em sistema integrado para análise de imagem e cálculo do volume. Os cortes histopatológicos foram quantificados em: adipócitos, estroma, regiões císticas e inflamação. O volume percentual de adipócitos remanescentes nas 5 modalidades revelou aos 360 dias: Aspirado - 13,9%; Corte - 34,6%; Dissecado - 45,2%; Tratado - 27,0%; Lavado - 16,4%, com $p = 0,003$.

INTRODUÇÃO

A lipoaspiração fez renascer o interesse pelo enxerto de tecido adiposo autólogo (12), seguindo-se de opiniões controvertidas.

A enxertia, com aparente simplicidade de transferência, apresenta variações de: técnicas de colheita, manuseio, tratamento, forma de injetar, tecido receptor, índice de absorção, etc.

Há grande dificuldade em estudos clínicos para se comparar resultados através das fotografias de pré e pós-operatório (7). Os estudos experimentais, por sua vez, analisam transplantes de pequenos volumes de tecido adiposo, ao redor de 1 ml (5, 6, 10, 15, 19), tornando difícil a avaliação quantitativa de sobrevida. Ou ainda, quantificam achados microscópicos de enxertos em cruces, dando julgamento subjetivo às respostas teciduais (4).

A heterogeneidade de resultados das publicações sobre este tema estimulou o desenvolvimento deste trabalho, para elucidar de forma quantitativa a sobrevida de enxertia do tecido adiposo, com diferentes métodos de colheita e tratamento.

MATERIAL E MÉTODO

Foram operados 25 coelhos, machos, da raça Nova Zelândia Branca, com 6 meses de idade e peso médio de 4,6 kg.

O tecido adiposo foi colhido do tecido celular subcutâneo das regiões escapulares, no dorso do coelho. Por randomização, um dos lados serviu para liposucção e o outro para dissecação.

O estudo compreendeu 5 modalidades de enxertia do tecido adiposo autólogo. Nas duas primeiras, o tecido foi obtido por sucção, sendo que a cânula de lipoaspiração com orifício de borda romba deu origem ao tecido da modalidade A (*aspirado*). A modalidade C (*corte*) foi obtida por cânula de bordas cortantes.

Nas três outras modalidades o tecido adiposo foi colhido por dissecação a céu aberto, com bisturi frio.

Em ambas as formas de sucção, as cânulas apresentavam diâmetro inteiro de 5 mm, bem como a agulha usada para injeção do transplante. A sucção foi produzida por motor de um cavalo de força. O tecido adiposo, extraído pela cânula, ficava coletado em seringa plástica e desta era, a seguir, injetado para

a região receptora sem qualquer tipo de manipulação ou tratamento.

O tecido adiposo colhido por dissecação foi fragmentado com tesoura em espécimes de aproximadamente 4 mm. O tecido fragmentado serviu para as modalidades *dissecado* (D), *tratado* (T) e *lavado* (L). O *tratado* (T) recebeu esta definição por serem adicionados 2 ml de meio de cultura de células 199 com sais de Earle. O *lavado* (L) foi submetido à lavagem com Ringer-lactato corrente em peneira.

As áreas receptoras dos enxertos foram as faces convexas das orelhas dos coelhos. Foram injetados 5 ml de tecido adiposo a cada uma das 5 modalidades. O tecido adiposo foi injetado, produzindo um cilindro ao longo do percurso da agulha. A pressão digital para injeção não oferecia qualquer resistência. Não se empregaram antibióticos.

Foram sacrificados 9 coelhos no 7º dia, 8 no 180º dia e outros 8 coelhos no 360º dia.

Os 5 cilindros de tecido foram colhidos das orelhas de todos os animais. Cada cilindro recebeu secções transversais, com distância constante de 1 centímetro (Fig. 1). As peças foram fixadas em formol tamponado 10%, pH 7.4, incluídas em parafina e coradas por hematoxilina-eosina.

Índice Morfométrico de Adipócitos, Estroma, Regiões Císticas e Inflamação

O tecido adiposo de 4 animais foi avaliado em todos os cortes microscópicos e em cada período de observação. Quantificou-se o teor de adipócitos, estroma, regiões císticas e inflamação.

Estes índices foram obtidos através do sistema de contagem de pontos, com ocular reticulada, em aumento de 100 vezes. O número médio de pontos contados por cilindro foi de 3503. Cada cilindro teve a soma absoluta dos seus pontos transformada em porcentagem de adipócitos, estroma, regiões císticas e inflamação, aos 7, 180 e 360 dias.

Quatro espécimes de tecido adiposo enxertado, obtidos do dorso de diferentes animais, foram processados em cortes histológicos e submetidos à contagem de pontos com ocular reticulada, para se obter os índices de adipócitos e estroma do tecido original.

Cálculo do Volume de Tecido Adiposo Enxertado Sobrevivente aos 7, 180 e 360 Dias

Todas as áreas de secção dos enxertos, nos diferentes níveis, foram quantificadas em área total em todos os animais dos 3 períodos de observação, com o auxílio de software analisador de imagem JAVA/Jandel Video Systems Inc. Este conjunto integrou computador a monitor de imagens e microscópio óptico, em aumento de 25 vezes. Foram computadas 776 áreas de secção transversa.

O volume final de cada cilindro foi calculado segundo a fórmula:

$$\text{Integral: } V = d \cdot \Sigma(a_i) \cdot k; \text{ onde:}$$

V - volume (mm^3); D - distâncias entre as secções (mm); e (a_i) - somatória das áreas (mm^2); k - constante para o índice de retração dos tecidos.

Determinação da Constante da Retração dos Tecidos (k)

Dezesseis espécimes de orelhas de coelhos tiveram a superfície da secção transversa avaliada a fresco. A superfície de secção foi carimbada em papel de filtro, demarcando-a. Esta superfície a fresco foi mensurada no analisador de imagens.

A somatória das áreas a fresco dividida pela somatória destas superfícies processadas em lâminas de microscopia óptica determinou o índice de retração destes tecidos.

Cálculo do Volume Percentual de Adipócitos Sobreviventes aos 360 Dias

O cálculo final da sobrevivência exclusiva de adipócitos seguiu a fórmula:

$$\text{Volume percentual de adipócitos remanescentes} = \frac{\text{Volume de tecido adiposo remanescente}}{\text{Volume inicial de tecido adiposo por cilindro (5 ml)}} \times \frac{\text{Teor de adipócitos no enxerto (reticulado)}}{\text{Teor de adipócitos no tecido não enxertado (reticulado)}}$$

Os dados referentes ao volume de tecido sobrevivente e os teores de adipócitos, estroma, regiões císticas e inflamação, obtidos no reticulado, foram submetidos a avaliação estatística pelo teste de Friedman, onde $p < 0,1$.

RESULTADOS

As orelhas de todos os coelhos desenvolveram evidente hiperemia e edema, iniciados ao redor do 3º dia que evoluiu espontaneamente na 2ª semana, sem qualquer infecção.

A observação clínica revelou nítida diminuição irregular de volume em todos os coelhos nas 5 modalidades de estudo, aos 180 e 360 dias (Fig. 2).

O tecido adiposo foi de fácil identificação macroscópica nas secções transversas dos cilindros, por diferencial de cor e presença de tênue tecido cicatricial circunscrevendo a área.

MICROSCOPIA

Análise Descritiva

O tecido adiposo transplantado apresentou grande diversidade de comportamento, não só entre os animais e modalidades, como no mesmo cilindro.

7º Dia

A análise microscópica descritiva não permitiu diferenciação entre as 5 modalidades de estudo de enxertia do tecido adiposo, exceção feita quanto à inflamação mais evidente nas modalidades obtidas por sucção. A avaliação microscópica no 7º dia mostrou formação de tecido conjuntivo cicatricial circundando o enxerto.

Nesse período, o processo inflamatório retratado por um exacerbado infiltrado linfo-plasmocitário, ocorreu da periferia para o centro. O enxerto revelou nítido halo basofílico entremeando os adipócitos, correspondendo a um acúmulo de células inflamatórias (Figs. 3 e 4).

O centro da área transplantada exibiu grande quantidade de adipócitos com arquitetura celular aparentemente preservada, sem sinais de penetração inflamatória ou vascular.

180º Dia

Nas 5 modalidades o tecido adiposo enxertado foi de fácil identificação por ter tênue tecido conjuntivo organizado na sua periferia. Houve grande quantidade de células adiposas com membranas íntegras e persistência marcante de células da inflamação. Estas foram representadas por macrófagos e células gigantes, portadores de grandes

vacúolos lipídicos.

Estroma reparacional esteve presente em praticamente todos os cortes, por vezes interceptando grupamentos de células inflamatórias e cistos lipídicos. O tecido conjuntivo fibroso reparacional foi mais freqüente na região central do tecido transplantado. Nesta fase, nas 5 modalidades, áreas de calcificação foram visualizadas em poucos cortes (Fig. 5).

360^o DIA

Na maior parte dos cortes encontrou-se tecido enxertado, com predomínio de adipócitos, cuja arquitetura celular manteve-se preservada.

As células da inflamação, principalmente macrófagos e células gigantes, o estroma central organizado e os cistos descritos aos 180 dias, aqui estavam presentes de maneira atenuada (Fig. 6, 7).

Índice Morfométrico de Adipócitos, Estroma, Regiões Císticas e Inflamação.

Observou-se, nas 3 fases de avaliação, diversidade de comportamento entre as 5 modalidades de enxerto do tecido adiposo.

7^o Dia (Tabela I)

O percentual de adipócitos, em D, T e L, foi próximo de 40%. O *aspirado* teve 23,3% de adipócitos e o *corte* 32,2%. As regiões císticas estiveram presentes nas 5 modalidades em índice semelhante (de 30,7% a 36,7%). A inflamação foi mais intensa no *aspirado* (31,7%) e *corte* (25,5%). As modalidades D, T e L, tiveram índices de inflamação ao redor de 17,5%.

180^o Dia (Tabela II)

O teor de adipócitos oscilou de 43,7 a 67,6% entre as modalidades, sendo que o menor valor foi obtido no *corte* e o maior, no *tratado*. Em A e C, as regiões císticas ocuparam índices semelhantes, próximos a 18%. A inflamação foi mais exuberante no *aspirado* (13,1%) e *corte* (10,8%). Os teores da inflamação de T e D foram 2,1% e 3,7%.

360^o Dia (Tabela III)

Nas 5 modalidades, a contagem de adipócitos no reticulado variou de 66,7% a 83,8%, valores considerados estatisticamente semelhantes.

O *lavado* apresentou a menor contagem de adipócitos, alta porcentagem de estroma (26,0%) e, ainda, a maior porcentagem em regiões císticas (6,2%), com diferença estatisticamente significativa em relação às demais modalidades de estudo.

O *dissecado* teve 0,1% de regiões císticas, o menor teor aos 360 dias. Teores também baixos foram registrados no *aspirado* (1,9%), no *corte* (1,5%) e no *tratado* (1,1%).

Um baixo teor de inflamação foi notado em todas as modalidades aos 360 dias. O *aspirado* apresentou o maior índice de inflamação (1,8%), ficando as demais modalidades ao redor de 1% (Tabela III).

A morfometria do tecido adiposo não enxertado revelou o teor médio de adipócitos de 83,0% e o de estroma de 17,0%.

A constante de retração dos tecidos (K) de orelhas desde sua colheita a fresco até o processamento em cortes histopatológicos foi de 2,29.

Volume de Tecido Adiposo Remanescente (Tabela IV)

7^o Dia - As médias percentuais de volume foram estatisticamente semelhantes entre as modalidades.

180^o Dia - *Aspirado* e *lavado* mostraram os menores níveis de sobrevivência (23,3 e 22,4%). *Corte* e *dissecado* foram os níveis mais preservados, com volumes semelhantes, respectivamente, de 65,1% e 63,8%. *Tratado* teve 34,5% de sobrevivência.

360^o Dia - *Aspirado* e *lavado* mostraram as mais baixas sobrevivências (16,3% e 20,4%). O maior volume médio remanescente de tecido adiposo enxertado foi o do *dissecado*, com 45,4%.

Volume Percentual de Adipócitos Remanescentes (Tabela V)

O cálculo do volume percentual médio de adipócitos remanescentes mostrou que, em C e D, o volume de adipócitos detectado aos 7 dias continuava presente aos 180 e 360 dias.

As modalidades A, T e L apresentaram significativa redução de volume de adipócitos entre 7 e 360 dias.

O maior volume remanescente de adipócitos, aos 360 dias, foi o *dissecado* (45,2%), seguido pelo *corte*

(34,6%), *tratado* (27,0%) e *lavado*. A menor sobrevivência de adipócitos foi no *aspirado*, com 13,9%.

DISCUSSÃO

O transplante de tecido adiposo carece de estudos experimentais e de mudanças na sua metodologia de obtenção e tratamento. O seu atual descrédito provavelmente já não será revertido por observações clínicas.

A falta de artigos na literatura que analisassem o transplante livre de tecido adiposo autólogo, sob o prisma da quantificação dos componentes tissulares da sua sobrevivência, estimulou a presente pesquisa.

A variação de resultados histopatológicos encontrados entre os cortes de um mesmo cilindro, na presente pesquisa, mostrou o quanto biópsias isoladas podem ser falhas. Esta variação foi ainda intensa dentro de um mesmo corte histopatológico. Este fato motivou a metodologia do presente trabalho a empregar avaliação quantitativa por contagem de pontos.

Os achados histopatológicos incluíram a degeneração de adipócitos, formação de cistos e vacúolos, tênue desenvolvimento de tecido conjuntivo capsular e infiltração inflamatória. Estes itens são concordes com os autores que estudaram o comportamento biológico dos transplantes de tecido adiposo^(10, 13, 14, 16, 17 e 18).

A observação microscópica, aos 180 e 360 dias, detonou que a substituição de adipócitos do transplante por tecido inflamatório-reparacional ocorreu no centro do cilindro, como descrito por GURNEY⁽¹⁰⁾ e ROSSATTI⁽¹⁹⁾.

A evolução do tecido adiposo aspirado mostra que esta modalidade manteve os mais altos níveis de inflamação aos 180 e 360 dias, respectivamente, de 13,1 e 1,8%. O volume global remanescente do tecido adiposo aspirado foi o mais baixo, 16,3%, aos 360 dias.

Estes valores retratam o trauma que a lipoaspiração causa sobre o tecido quando da sucção com cânula de borda romba.

O *tratado* apresentou índices semelhantes aos do (D) no retículo, na contagem de adipócitos, estroma e inflamação, aos 7 dias.

No entanto, o volume final do tecido remanescente

da modalidade *tratado* foi de 31,4%, significativamente inferior aos 45,4% do (D).

A tentativa de melhorar a sobrevivência de adipócitos, através da adição de meio de cultura, redundou em prejuízo do transplante, provavelmente por dificultar a adesão do mesmo aos tecidos receptores.

O volume líquido de adipócitos nas modalidades *corte* e (D) foi mantido constante nas 3 fases de observação. Este achado sugere que a lesão de adipócitos deve ter ocorrido predominantemente na colheita ou nos primeiros dias de transplantação.

O mesmo não ocorreu nas modalidades *aspirado*, *tratado* e *lavado*. No *aspirado*, aos 7 dias o volume líquido de adipócitos foi de 20,4%, sendo reduzido para 13,9% aos 360 dias. No *tratado* a queda foi de 40,1% aos 7 dias para 27% aos 360 dias. No *lavado*, a redução foi de 38,6% para 16,4%.

A acentuada queda de adipócitos no *lavado* faz supor que o ato de lavar com Ringer-lactato não só não promoveu eficiente remoção de lipídio extracelular, pois não diminuiu a inflamação em relação ao (D) e *tratado*, como também deve ter propiciado elevado índice de pequenas rupturas nas membranas dos adipócitos. Esta suspeita é fortalecida por ser o *lavado* a modalidade que mais formou regiões císticas aos 360 dias.

Estes resultados se contrapõem aos autores que insistem no valor de lavagens exaustivas do tecido adiposo^(2, 3, 8, 9, 11, 12) e à sugestão da American Society of Plastic and Reconstructive Surgery⁽¹⁾ que recomendou lavagem com solução de Ringer.

O alto índice de adipócitos no retículo nas 5 modalidades aos 360 dias, variando de 66,7% a 83,8%, dá indícios de que o transplante, nesta fase, apresentou bom nível de estabilidade, principalmente se comparado aos 83% de adipócitos encontrados no tecido adiposo não transplantado. Dá para supor que as áreas ocupadas por inflamação e regiões císticas deverão evoluir por substituição de tecido conjuntivo fibroso, à semelhança do estroma (17%) do tecido original.

Quanto ao tecido transplantado, pode-se deduzir sua viabilidade ao longo da experimentação pelo tipo de resposta tecidual do hospedeiro, mesmo que a microscopia óptica não possa de forma direta afirmar a integridade do adipócito. Aos 7 dias, o tecido lesado suscita acentuada inflamação. Em períodos longos de

observação (180 e 360 dias), o adipócito lesado já foi substituído por tecido conjuntivo. Nessas fases, os escassos restos celulares foram fagocitados, facilitando a dedução de que os adipócitos remanescentes devem ser viáveis.

Na modalidade *corde*, a coerência dos baixos teores de inflamação e estroma e o alto teor de adipócitos do reticulado, aos 360 dias, somada à manutenção do volume líquido de adipócitos dos 7 aos 360 dias, faz deduzir que a lesão de adipócitos ocorreu predominantemente no momento do trauma da colheita.

Entretanto a modalidade (D), que teve o menor trauma possível na colheita, apresentou uma sobrevida de apenas 45%. Como no momento de sua fragmentação, o tecido adiposo foi imerso em solução dita "fisiológica", esta solução torna-se suspeita.

A solução salina recebeu a designação de fisiológica por ser isotônica à hemácia. Tendo sido criada originalmente para fins de infusão endovenosa. Não necessariamente essa isotonicidade se aplica ao adipócito.

Fica a dúvida "o que seria uma solução fisiológica para o adipócito?"

É bem sabido que em laboratórios, quando se quer lesar células em cultura, faz-se adição de água destilada, promovendo a sua rápida entrada na célula por diferença de pressão osmótica e a imediata ruptura da membrana celular.

A atuação saneadora das células inflamatórias produz a liberação de radicais livres, a partir das membranas celulares lesadas. A presença de processo inflamatório, a nível de paniculite, produz absorção de tecido adiposo local, independente de ser ou não tecido transplantado.

A associação destes fatos faz supor que o transplante de tecido adiposo possa ser menos absorvido se for promovida a neutralização dos radicais livres.

A presente pesquisa deixa mais esta dúvida a ser esclarecida no futuro.

CONCLUSÕES

A presente pesquisa de 5 diferentes modalidades de transplante livre de tecido adiposo autólogo, em coelhos, pode concluir :

1. O tecido aspirado por cânula de orifício com borda romba suscitou o maior teor de inflamação e evoluiu com a menor sobrevida.
2. O tecido obtido por aspiração, com cânula de orifício com corte, resultou na segunda maior sobrevida com diferença importante do *aspirado*.
3. A adição de meio de cultura 199 com sais de Earle ao tecido colhido por dissecação a bisturi-tratado não beneficiou a sobrevida de adipócitos.
4. O ato de lavar o tecido dissecado com Ringer-lactato, produziu lesão de adipócitos, elevada formação de cistos e baixa sobrevida do transplante adiposo lavado.
5. O tecido dissecado, colhido por bisturi e mergulhado em solução salina fisiológica resultou na maior sobrevida entre as modalidades de estudo.

BIBLIOGRAFIA

Vide páginas 42 a 44.