Luiz Alexandre Lorico Tissiani

**Análise comparativa de enxertos de gordura em
refinamentos de reconstrução mamária com
e sem suplementação de células-tronco**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para a
obtenção de título de Doutor em Ciências

Programa de Clínica Cirúrgica

Orientador: Prof. Dr. Nivaldo Alonso

São Paulo

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Tissiani, Luiz Alexandre Lorico

Análise comparativa de enxertos de gordura em refinamentos de reconstrução
mamária com e sem suplementação de células-tronco / Luiz Alexandre Lorico
Tissiani. -- São Paulo, 2016.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Clínica Cirúrgica.

Orientador: Nivaldo Alonso.

Descritores: 1.Adipócitos 2.Transplante de células-tronco mesenquimais
3.Imunofenotipagem 4.Citometria de fluxo 5.Mama 6.Mamoplastia 7.Retalhos
cirúrgicos 8.Implantes de mama 9.Neoplasias da mama 10.Carcinoma ductal de
mama 11.Recidiva local de neoplasia 12. Necrose gordurosa 13.Imagem por
ressonância magnética

USP/FM/DBD-014/16

DEDICATÓRIA

À memória de meus pais Carmela e Waldomiro, que me mostraram
o caminho da persistência, do amor e da honestidade;

Aos meus filhos Clara e Rafael, a quem amo profundamente e que
fizeram esta jornada ter um sentido;

AGRADECIMENTOS

Aos meus e minhas pacientes que me permitiram trilhar o caminho da Medicina até os dias de hoje.

Ao Prof. Dr. Nivaldo Alonso pela oportunidade, confiança e suporte contínuos.

A Profa. Dra. Maria Rita Passos-Bueno pelo inestimável suporte, orientação, estímulo e realização de toda a parte laboratorial.

A Dra. Meire Agüena por todo o seu esforço e disponibilidade, pela amizade, estímulo e dedicação incansáveis.

Ao Dr. Paulo Kharmandayan pela amizade, incentivo e primorosa correção.

Ao Dr. Elvio Bueno Garcia pela análise precisa e pelo incentivo cordial.

Ao Dr. José Carlos Marques Faria pelo empenho nas orientações metodológicas.

Ao Prof. Dr. Marcio Paulino pelas orientações.

Ao Dr. Endrigo Bastos pela amizade e ensino tecnológico.

Ao Dr. Roberto Fanganielo pelas orientações metodológicas.

Aos Biomédicos Emerson Duarte, Karina Dorna, Luciane Campos e Juliana Conti pela disposição, gentileza e orientações técnicas na realização das ressonâncias magnéticas.

A Dra. Rosângela Lira pelo incentivo e dedicação nas anestésias realizadas no Hospital Municipal Carmino Caricchio.

Aos colegas Adelina Fatima Nascimento, Alessandra Grassi Sales, Eduardo Mordjkian, Luis Philippe Vana, Meire Augusto Oliveira Bruscin pela valiosa avaliação dos painéis de resultados.

Aos Residentes e Ex-Residentes do Serviço de Cirurgia Plástica do Conjunto Hospitalar do Mandaqui:

Monica Rocco, Melissa Machado Ferreira, Khaled Bazzi, Gustavo Pasqual, Beatriz Formighieri, Leandro Villela, Luciana Vasconcelos Sá, Nadia de Rosso Giuliani, Helio Itapema, Ronaldo Gorga, Diego Ricardo Colferai, Rafael Frota, Rodrigo Nascimento e Mayara Nogueira; pela inestimável ajuda e pela curiosidade incentivadora.

Aos meus grandes amigos, parceiros e irmãos de infância, Marcelo Nannini e Marco Tornelli, que fizeram dos dias desta longa caminhada mais divertidos e menos pesados.

As amigas e companheiras de trabalho Rosa Marquezini, Maira Siqueira, Luciana Zuker e Rosangela Polydoro pelo carinho, incentivo e alegria.

A Sra. Eliane Mônaco pela amizade e ajuda contínua e precisa.

A minha esposa Ana Cristina pela dedicação, logística e compreensão.

Aos meus irmãos Luiz Antonio e Luiz Eduardo por me criar com dedicação e amor.

Aos meus amados filhos Clara e Rafael, fonte de inspiração, por disporem de seu precioso tempo para que eu pudesse estudar.

A sabedoria não nos é dada. É preciso descobri-la por nós
mesmos, depois de uma viagem que ninguém
nos pode poupar ou fazer por nós.

Marcel Proust

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

ABNT NBR 14724 (Associação Brasileira de Normas Técnicas, 2005), estilo Vancouver.

Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A.L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso e Valéria Vilhena. 3ª ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011. Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina.

SUMÁRIO

Lista de figuras	
Lista de gráficos	
Lista de tabelas	
Lista de abreviaturas	
Lista de símbolos	
Resumo	
Abstract	
1 Introdução	1
2 Objetivos.....	3
3 Revisão da Literatura.....	4
3.1 Enxerto de Gordura.....	4
3.2 Células-tronco.....	10
3.3 Enxertos de Gordura em Mama, Reconstrução Mamária e Risco Oncológico	16
4 Método	25
4.1 Cálculo Amostral	26
4.2 Avaliação Pré-operatória.....	27
4.3 Cirurgia.....	28
4.4 Análise Laboratorial.....	33
4.5 Volumetria Mamária.....	35
4.6 Avaliação da satisfação pelas pacientes	39
4.7 Avaliação por cirurgias plásticas.....	39
4.8 Análise Estatística.....	40
5 Resultados	43
6 Discussão.....	61
7 Conclusões	75
8 Anexos	76
9 Referências	91
Apêndices	

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Evolução volumétrica dos enxertos de gordura	7
Figura 2:	Esquema de diferenciação das células presentes na FVE.....	15
Figura 3:	Bobina utilizada no exame de RNM das mamas	27
Figura 4:	Marcação pré-operatória e diagrama da mama.....	28
Figura 5:	Apresentação da gordura antes e depois da centrifugação	29
Figura 6:	Mesa cirúrgica e o processo de digestão enzimática da gordura	31
Figura 7:	Desenho esquemático do processo de enriquecimento 2:1	32
Figura 8:	Reconstrução 3D do Tórax realizada pelo OsiriX®	36
Figura 9:	Demarcação mamária prévia ao exame de RNM.....	37
Figura 10:	Cálculo volumétrico de uma reconstrução mamária com o retalho TRAM	38
Figura 11:	Painel fotográfico para avaliação dos resultados.....	40
Figura 12:	Correlação entre expressão de marcadores e a persistência volumétrica.....	51
Figura 13:	Fotografias de antes e depois da paciente 9 do grupo tronco.....	57
Figura 14:	Fotografias de antes e depois da paciente 7 do grupo tronco	58
Figura 15:	Fotografias de antes e depois da paciente 7 do grupo controle	59
Figura 16:	Fotografias de antes e depois da paciente 4 do grupo controle	60

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Tipos histológicos tumorais.....	44
Gráfico 2: Distribuição de radioterapia	46
Gráfico 3: Incidência de esteatonecrose.....	46
Gráfico 4: Distribuição das técnicas de reconstrução mamária.....	48
Gráfico 5: Dispersão unidimensional da celularidade basal.....	48
Gráfico 6: Dispersão unidimensional do marcador CD90.....	50
Gráfico 7: Avaliação da satisfação com o resultado da reconstrução mamária	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Enxertos de gordura em mamas sadias.....	18
Tabela 2: Dados demográficos das pacientes dos dois grupos (GT e GC).....	43
Tabela 3: Análise quantitativa e qualitativa dos enxertos de gordura dos dois grupos (GT e GC)	45
Tabela 4: Medidas-resumo dos marcadores celulares (CD29, CD31, CD34, CD45, CD73, CD90 e CD105) das pacientes dos grupos tronco e controle.....	49
Tabela 5: Estimativas dos coeficientes de correlação linear de Pearson entre persistência volumétrica e cada marcador celular.	52
Tabela 6: Distribuição da impressão (opinião) de cada avaliador para as pacientes dos grupos tronco e controle.....	55
Tabela 7: Estimativas pontuais e intervalares do coeficiente de concordância Kappa generalizado para as pacientes dos grupos tronco e controle	56
Tabela 8: Medidas-resumo da nota geral dada pelos avaliadores às pacientes dos grupos tronco e controle.	56

LISTA DE ABREVIATURAS

atm	atmosfera
bit	unidade de medida das ciências da computação
cels.	células
cols.	colaboradores
cm ³	centímetro cúbico
ed.	edição
fig.	figura
g	grama
g	unidade de força gravitacional
h	hora
kg	quilograma
kg/m ²	quilograma por metro quadrado
ml	mililitro
mm	milímetro
mM	miliMolar
p	erro estatístico alfa
tab.	tabela
µl	microlitro

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	graus Celsius
=	igual a
>	maior que
®	marca registrada
<	menor que
-	menos
%	porcentagem

LISTA DE SIGLAS

ADSC	Adipose Derived Stromal/Stem Cells
CAL	Cell Assisted Lipotransfer
CONEP	Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
CTDG	Células Tronco Derivadas da Gordura
FCR	Força Centrífuga Relativa
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
FVE	Fração Vascular- Estromal
HGF	Hepatocyte Growth Factor
HMCC	Hospital Municipal Carmino Caricchio
IFATS	International Federation for Adipose Therapeutics and Science
IGF1	Insulin-like Growth Factor 1
IMC	Índice de Massa Corporal
INCA	Instituto Nacional do Câncer
iPS	Induced Pluripotent Cells
KCl	Cloreto de Potássio
KH_2PO_4	Fosfato de Potássio Monobásico
LENT-SOMA	Late Effects on Normal Tissues - Subjective, Objective, Management, Analytic
NaCl	Cloreto de Sódio
Na_2HPO_4	Fosfato de Sódio Dibásico
PLA	Processed Lipoaspirate Cell(s)
RNM	Ressonância Nuclear Magnética

ROI	Region of Interest (região de interesse)
RT-PCR	Real Time Polimerase Chain Reaction
SITC	Sociedade Internacional de Terapia Celular
TCCM	Tratamento Conservador do Câncer de Mama
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TRAM	Retalho do Músculo Reto do Abdome com Ilha Transversa
USP	Universidade de São Paulo
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

RESUMO

Tissiani LAL. *Análise comparativa de enxertos de gordura em refinamentos de reconstrução mamária com e sem suplementação de células-tronco* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2016. 105p.

INTRODUÇÃO: Os enxertos de gordura tem se mostrado como uma poderosa técnica cirúrgica em reconstrução mamária secundária e os enxertos enriquecidos com células-tronco, além de suas ações parácrinas, vem apresentando resultados encorajadores no que tange a persistência volumétrica. **OBJETIVO:** Este estudo clínico teve como objetivo analisar comparativamente quantitativa e qualitativamente enxertos de gordura enriquecidos com células da fração vâsculo-estromal em reconstrução mamária secundária e a incidência de complicações. **MÉTODO:** Nós desenvolvemos um método que produz enxertos de gordura, na sala de cirurgia, em uma taxa de enriquecimento maior que os já publicados (2:1). Este estudo clínico prospectivo e controlado analisou qualitativa e quantitativamente enxertos de gordura com (GT – grupo tronco) e sem (GC – grupo controle) adição das células da fração vâsculo-estromal fresca em reconstrução mamária secundária; através de volumetria mamária por RNM de mamas, imunofenotipagem e contagem celular. Também foram estudados os resultados estéticos, a satisfação das pacientes e as complicações. **RESULTADOS:** A persistência volumétrica no GT foi 78,9% e 51,4% no GC, entretanto não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos. CD90 foi o marcador mais expresso e que alcançou diferença significativa e ao mesmo tempo apresentou correlação positiva entre a sua expressão e a persistência volumétrica ($r=0.651$, $p=0.03$). Necrose gordurosa ocorreu, isoladamente em 4 pacientes do GT submetidas à radioterapia e nenhuma paciente do GC apresentou este evento. Desta forma, pacientes do GC mostraram tendência de estar mais satisfeitas com o enxerto de gordura. Nos dois grupos, os resultados estéticos foram iguais e não foram observadas recidivas loco-regionais. **CONCLUSÃO:** Os resultados do enriquecimento em uma taxa maior que as já publicadas são encorajadores, apesar de a persistência volumétrica não ter alcançado diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Enxertos de gordura enriquecidos na proporção 2:1 podem não ser indicados para pacientes submetidas à radioterapia apesar de terem se mostrados seguros num tempo de seguimento de 3 anos.

Descritores: adipócitos; transplante de células-tronco mesenquimais; imunofenotipagem; citometria de fluxo; mama; mamoplastia; retalhos cirúrgicos; implantes de mama; neoplasias da mama; carcinoma ductal de mama; recidiva local de neoplasia; necrose gordurosa; imagem por ressonância magnética.

ABSTRACT

Tissiani, LAL. *A prospective and controlled clinical trial on stromal vascular fraction enriched fat grafts in secondary breast reconstruction* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2016. 105p.

BACKGROUND: Fat grafting is a tremendous tool in secondary breast reconstruction. Stromal vascular fraction (SVF) enriched fat grafts have been presenting promising results regarding volume maintenance. **OBJECTIVE:** The main purpose of this study was to analyze comparatively SVF-enriched fat grafts in secondary breast reconstruction: volumetric persistence, expression of surface markers and complications. **METHODS:** We developed a method that produces a superior SVF enrichment rate (2:1) in the operating theatre. This prospective and controlled trial analyzed quantitatively and qualitatively fat grafts with (stem cells group – SG) and without (control group – CG) SVF enrichment in secondary breast reconstruction, through MRI-based volumetry, immunophenotyping and cell counting. Also, patient satisfaction, aesthetic outcomes and complications were analyzed. **RESULTS:** Volumetric persistence in the SG was 78,9% and 51,4% in the CG, however it did not reach statistical significant difference. CD90 was the only marker highly expressed in the SG and showed a positive correlation with volumetric persistence ($r=0.651$, $p=0.03$). Fat necrosis occurred in 4 patients in the SG and in none in the CG. Patients in the CG showed a trend to be more satisfied. Considering aesthetics, both groups presented improvements. No locoregional recurrences were observed. **CONCLUSIONS:** Results are encouraging despite the fact that SVF enrichment in a higher supplementation rate did not improve, with statistical significance, fat graft volumetric persistence. Enriched fat grafts have proven to be safe in a 3-years follow up, however they do not seem suitable for patients that received radiotherapy.

Descriptors: adipocytes; mesenchymal stem cell transplantation; immunophenotyping; flow cytometry; breast; mammaplasty; surgical flaps; breast implants; breast neoplasms; carcinoma, ductal, breast; neoplasm recurrence, local; fat necrosis; magnetic resonance imaging.

1 Introdução

A mama feminina tem grande simbologia para a mulher. Está indissociavelmente relacionada com a imagem corporal, a feminilidade, a sexualidade e a maternidade; de maneira que a perda da mama tem forte impacto sobre a mulher. A incidência do câncer de mama vem aumentando nos países desenvolvidos e em desenvolvimento e, segundo o Instituto Nacional do Câncer – INCA, 57.120 casos novos de câncer de mama foram previstos para o ano de 2015⁽¹⁾. Nos EUA, foram previstos aproximadamente 290.000 novos casos de câncer de mama, incluindo as neoplasias invasivas e não-invasivas, para o mesmo período⁽²⁾. Cirurgias mamárias como quadrantectomias e as diferentes formas de mastectomia, consequentemente, vem aumentando também. Na população mundial, a sobrevida média para o câncer de mama após 5 anos é de 61%⁽¹⁾.

A lei 12.802/2013 passou a obrigar, no âmbito do Sistema Único de Saúde – SUS, a reconstrução imediata da mama após a cirurgia oncológica sempre que as condições clínicas da paciente permitirem. Casuística americana mostra que atualmente, naquele país, aproximadamente 40% dos casos das reconstruções mamárias são imediatas⁽³⁾. A reconstrução mamária, seja ela imediata ou tardia, contempla uma grande quantidade de procedimentos cirúrgicos e todos eles, independentemente do aperfeiçoamento com que são executados carregam em si a possibilidade de insucesso, parcial ou total⁽⁴⁾. Desta maneira, fica implícito que todo e qualquer procedimento de reconstrução mamária, envolvendo tecidos autólogos e

materiais aloplásticos, isoladamente ou em associação, pode culminar com irregularidade de contorno da mama operada⁽⁵⁾; o que poderá requerer novos procedimentos para sua correção. Antes do advento da lipoaspiração⁽⁶⁾, os cirurgiões plásticos tinham que recorrer às cirurgias de grande porte como novos retalhos, implantes complementares ou mesmo pela troca de implantes mamários existentes⁽⁷⁾. Há uma década, os enxertos de gordura vem sendo utilizados em diversos momentos do processo de reconstrução mamária⁽⁸⁾, seja na melhoria das condições dos tecidos irradiados⁽⁹⁾, nas irregularidades de contorno resultantes do tratamento conservador do câncer da mama (TCCM)⁽¹⁰⁾, como no preparo do tórax para o recebimento de expansores e implantes mamários^(11,12), entre outras indicações⁽¹³⁻¹⁸⁾.

Apesar das evoluções técnicas dos enxertos de gordura desde a sua introdução, principalmente o desenvolvimento da lipoenxertia estruturada⁽¹⁹⁾, diversos artigos nacionais e internacionais mostraram que os enxertos de gordura ainda apresentam uma taxa de integração não previsível⁽²⁰⁾. Esforços tem sido desenvolvidos pela comunidade científica para que este procedimento, considerado como padrão-ouro na reconstrução mamária secundária, apresente melhores taxas de sobrevivência no leito receptor^(14,21,22). Todo este esforço tem como principal objetivo melhorar a autoestima e, conseqüentemente, a qualidade de vida das pacientes acometidas pelo câncer de mama⁽²³⁻²⁵⁾.

Com o olhar voltado para uma exigência estética cada vez maior por parte das pacientes que tiveram suas mamas reconstruídas, para a necessidade do desenvolvimento de novas tecnologias que assegurem melhores índices de integração dos enxertos de gordura e para a segurança oncológica do procedimento, é que este estudo clínico foi desenvolvido.

2 Objetivos

O principal objetivo deste trabalho foi analisar a persistência volumétrica de enxertos de gordura com e sem enriquecimento com células da fração vâsculo-estromal (FVE) do tecido adiposo, numa taxa de enriquecimento maior do que os já publicados na literatura, através da volumetria mamária por RNM da mama. O objetivo secundário foi avaliar a existência de correlação entre a manutenção volumétrica e o perfil fenotípico das células da FVE. O objetivo terciário foi anotar a incidência de complicações dos enxertos de gordura com e sem enriquecimento e a satisfação das pacientes com os resultados obtidos.

3 Revisão da Literatura

3.1 Enxerto de Gordura

À Neuber (1893)* citado por Billings e May⁽²⁶⁾, foi atribuído o primeiro enxerto de gordura, no qual pequenos fragmentos de tecido adiposo foram utilizados para corrigir depressões de partes moles. À época, demonstrando preocupação com a sobrevivência do tecido transplantado, concluiu que os enxertos não deveriam ser maiores que uma amêndoa. Czerny(1895)[†] citado por Billings e May⁽²⁶⁾ foi o primeiro cirurgião a transferir tecido adiposo, ainda que na forma de um lipoma, para reconstruir uma mama após adenectomia por mastite crônica. Lexer⁽²⁷⁾, no início do século XX, fez diversos transplantes de tecido adiposo, sempre em blocos, mas com resultados clínicos desfavoráveis devido à absorção de grande parte de seus enxertos.

Marchand(1919)[‡] citado por Billings⁽²⁶⁾, analisou a histologia de um enxerto de gordura em bloco para o tratamento de um defeito da calota craniana. Com 10 dias de evolução havia um misto de adipócitos íntegros e de células arredondadas parecidas com histiócitos apresentando gotículas de gordura em seus citoplasmas.

* Neuber, G. Asepsis und kunstliche Blutleere. *Verhandl. d. deutsch. Gesellsch. f. Chir.* 22:159,1910.

† Czerny, A. Plastischer Ersatz der Brustdruse durch ein Lipoma. *Chir. Kongr. Verhandl.* 2:216,1895.

‡ Marchand, F. Ueber die Veränderungen des Fettgewebes nach der Transplantation in einen Gehirn-defekt mit Berücksichtigung der Regeneration desselben und der kleinzelligen Infiltration des Bindegewebes. *Beitr. z. Path. Anat. u. z. Allg. Path.* 66:32,1919.

Esta foi a primeira evidência, ainda que precoce, de que parte dos adipócitos presentes no enxerto de gordura sobreviviam.

Em 1923, Neuhoof, o defensor da “Teoria da Substituição Celular”, propôs que todos os adipócitos presentes no enxerto morriam em consequência da isquemia e que seriam substituídos ou por novos adipócitos provenientes do leito receptor ou por tecido cicatricial⁽²⁸⁾.

Peer, em 1950, publicou estudo em humanos, onde realizou enxertos de gordura isógenos e autólogos (pequenos blocos e enxertos picados) sobre os músculos retos do abdome. Removeu os enxertos para análise histológica com 4, 8, 12 e 21 dias e mais tardiamente com 3, 4 a 8 e 8 a 14 meses. Concluiu que com 4 dias já havia anastomose entre vasos do enxerto e do leito receptor e que nas primeiras semanas o cenário era de necrose de parte dos adipócitos enxertados entremeados por intenso infiltrado inflamatório (leucócitos polimorfonucleares e linfócitos) e histiócitos preenchendo cistos. Ao final do terceiro mês havia um menor número de vacúolos preenchidos por histiócitos, um grande número de vasos sanguíneos e a presença de adipócitos com aspecto de normalidade. O enxerto estava envolto por uma fina cápsula de tecido conjuntivo. No quarto mês, os adipócitos apareciam com membranas celulares intactas e núcleos normais e já não havia espaços císticos e infiltrado celular. Existia uma quantidade moderada de vasos sanguíneos. Ao fim do décimo quarto mês o aspecto histológico mudava muito pouco, de maneira que o tecido adiposo enxertado apresentava aspecto absolutamente normal circundado por uma cápsula de tecido conjuntivo bem fina.

Ao final de 14 meses, a permanência dos enxertos em blocos pequenos foi de 51%, dos enxertos picados foi de 38% e os enxertos isógenos foram

completamente absorvidos já ao final do terceiro mês, restando apenas um grande cisto revestido por espessa cápsula de tecido conjuntivo. Assim, ficou postulada a “Teoria da Sobrevivência Celular”⁽²⁹⁾.

Em 1983, Illouz apresentou à comunidade científica internacional sua experiência com mais de 3000 casos de lipoaspiração corporal, a qual teve início no final da década de setenta⁽⁶⁾. O uso de cânulas para obter o tecido adiposo mudou definitivamente a história da cirurgia plástica e dos enxertos de gordura, que, de blocos, passaram a uma apresentação liquefeita. A lipoaspiração ganhou o mundo e a partir de 1986 surgiram os primeiros trabalhos empregando o tecido adiposo em sua nova apresentação^(19,30-37)(Anexo A).

Muitos autores relataram sucesso e demonstraram a versatilidade da gordura como um preenchedor de partes moles e todos relataram a ocorrência, em diferentes graus, de absorção parcial dos enxertos; o que os levou à realização de sobrecorreção^(31,32,35,37). Anos mais tarde, Niechajev e Sevcuk, empregando um lipoaspirador, constataram que a obtenção do tecido adiposo sob pressão de -0,95 atm era mais danosa ao adipócito que a pressão de -0,5 atm, dados estes confirmados anos mais tarde⁽³⁸⁾. Assim, demonstraram que era importante obter a gordura sob baixa pressão de aspiração, manipular o tecido delicadamente e enxertar o tecido em várias camadas e túneis com o objetivo de aumentar a embebição plasmática dos adipócitos enxertados⁽³⁹⁾. Acreditava-se que a nutrição, proveniente do leito receptor, poderia nutrir células até 1,5 mm no interior do enxerto⁽⁴⁰⁾.

Em comum, estes trabalhos mostraram baixos índices de complicações (entre 2% e 5%) e também o entendimento de que os enxertos de gordura mantinham-se presentes em pós-operatórios de longo prazo, porém com o volume

reduzido⁽¹⁵⁾. Com o objetivo de melhorar a integração, diversos autores propuseram, em estudos clínicos e experimentais, a adição de substâncias aos enxertos de gordura como fatores de crescimento plaquetários, meios de cultura celular, co-enzima Q10, interleucina 8 entre outros^(38,41-44). Entretanto, não foram adotados pela comunidade de cirurgiões plásticos.

Em 1991, Horl et al.⁽³⁴⁾ foram os primeiros a medir objetivamente o volume dos enxertos de gordura. Utilizaram exames de ressonância nuclear magnética (RNM) para monitorar a manutenção volumétrica de enxertos de gordura realizados na região periorbital. Demonstraram que ao final do 6º mês os enxertos apresentavam uma perda volumétrica aproximada de 55,3%. A partir deste momento, os enxertos entravam num período de estabilidade volumétrica até o 12º mês (Figura 1).

A grande diversidade de táticas existentes em relação à lipoaspiração, a falta de entendimento de qual era a melhor maneira de obter, processar e enxertar a gordura, e que culminou com grande imprevisibilidade dos resultados; levou alguns autores a publicar resultados de médio e longo prazo muito desfavoráveis⁽⁴⁵⁾.

Figura 1: Gráfico demonstrando a evolução volumétrica dos enxertos de gordura no período pós-operatório: do 6º dia ao 12º mês

Sob o nome “enxerto de gordura” havia uma infinidade de diferentes cirurgias⁽⁴⁶⁾. Estas publicações, se por um lado e indevidamente, macularam a gordura como fonte de tecido autólogo para o preenchimento de partes moles; por outro fizeram com que a comunidade científica lançasse um novo olhar sobre estes enxertos e as possíveis causas da heterogeneidade de resultados^(45,47). Em 1997, Coleman publica artigo em que estabelece o passo a passo da tática que chamou de “lipoenxertia estruturada” e que envolve a sistematização dos processos de obtenção, preparo e enxertia da gordura; algo até então inexistente nesta técnica cirúrgica⁽¹⁹⁾. Segundo o autor, a obtenção da gordura deve ser realizada com baixas pressões de aspiração, o preparo deve utilizar centrifugação a 1200 g por 3 minutos e, a enxertia propriamente dita, ser realizada em múltiplas camadas enxertando pequenas quantidades de gordura de modo a favorecer a embebição plasmática. Nesta mesma publicação Coleman chamou atenção para o tamanho ideal dos glóbulos de gordura: “...nem muito pequenos para não sofrer fagocitose e nem muito grandes para não sofrer isquemia”⁽⁴⁸⁾.

Após a introdução da enxertia estruturada alguns autores decidiram estudar o impacto da centrifugação sobre o tecido adiposo como um todo e também sobre os adipócitos mais especificamente^(49,50). A centrifugação, independentemente da força centrífuga relativa aplicada, sempre promove uma separação em 3 fases do tecido adiposo obtido pela lipoaspiração: uma camada menos densa composta por óleo, uma camada mais densa composta por sangue e solução de infiltração e uma camada intermediária composta pelo tecido adiposo em si. Boschert et al. constataram que não havia separação adicional das camadas após 2 minutos de centrifugação a 50g e que a camada intermediária não era homogênea. Dividiram a

camada intermediária em 3 zonas e, após digestão enzimática e aplicação do teste de exclusão celular pelo azul de tripan, concluíram que a zona mais densa possuía 250% e 140% mais adipócitos íntegros se comparada às zonas superficial e intermediária, respectivamente⁽⁴⁹⁾.

Rohrich et al. demonstraram que abdome, flanco e regiões internas de joelho e coxa doam adipócitos igualmente viáveis e que a centrifugação da gordura a 500 g por 2 minutos é absolutamente segura para estas células e cumpre a função de separar debris celulares, óleo e sangue da gordura a ser enxertada⁽⁵⁰⁾.

Corroborando os achados acima mencionados, Allen Jr. et al. demonstraram em estudo murino que, após centrifugação, a gordura mais densa quando enxertada no dorso do animal apresentou, com 10 semanas de pós-operatório, maior retenção volumétrica, melhor arquitetura tecidual, maior expressão de CD31, o dobro do número de células progenitoras estromais e maiores quantidades de fatores de crescimento quando comparada à gordura menos densa⁽⁵¹⁾.

Em 2007 Kaufmann et al. concluíram, após a análise de questionários, que mais da metade dos cirurgiões participantes haviam incorporado a lipoenxertia estruturada em suas rotinas cirúrgicas, 90% realizavam entre 20% e 30% de sobrecorreção e que 70% achavam que os enxertos de gordura apresentavam resultados duradouros, acima de 2 anos⁽⁵²⁾.

Mas não é apenas no universo da cirurgia plástica que os enxertos de gordura são empregados com sucesso. Diversos autores os tem utilizados em situações como síndrome dolorosa pós-mastectomia⁽⁵³⁾, aumento de cordas vocais para insuficiência glótica⁽⁵⁴⁾, remodelagem cicatricial tardia⁽⁵⁵⁾, correção de ectrópio cicatricial⁽⁵⁶⁾ e tratamento da seqüela de radioterapia no tórax⁽⁹⁾ e em membros⁽⁵⁷⁾ entre outras indicações⁽⁴⁸⁾.

As publicações de Zuk, Zhu et al. em 2001 e 2002 inauguraram uma nova era, onde o tecido adiposo reconhecidamente passou a ser fonte de uma grande quantidade de células-tronco mesenquimais que, sob condições especiais, poderiam formar osso, cartilagem, músculo, participar da formação de pequenos vasos e, por fim, se transformar em células do tecido adiposo (diferenciação adipogênica)^(58,59). Aproveitando esta última propriedade das células-tronco mesenquimais presentes na FVE do tecido adiposo, Yoshimura et al. desenvolveram a forma mais atualizada e sofisticada da história dos enxertos de gordura até o momento: o enxerto de gordura suplementado com células da FVE do tecido adiposo, técnica que recebeu a sigla CAL (Cell Assisted Lipotransfer)⁽⁶⁰⁾.

3.2 Células-tronco

Conceitualmente, células-tronco são células indiferenciadas capazes de se proliferar mantendo sua indiferenciação e de se diferenciar em uma linhagem celular funcional, assim como regenerar tecidos que sofreram algum tipo de agressão⁽⁶¹⁾. Basicamente existem dois principais tipos de células-tronco: as embrionárias e as adultas. Entretanto, após o importante trabalho de Takahashi e Yamanaka, um terceiro tipo de células pluripotentes foi desenvolvido: as células com pluripotência induzida (iPS cells – induced pluripotent stem cells)⁽⁶²⁾. Estas células contornam o problema ético do uso das células embrionárias, mas o processo de indução da pluripotência ainda apresenta um baixo rendimento celular.

As células-tronco embrionárias são derivadas da massa interna do blastocisto e são consideradas pluripotentes e capazes de se diferenciar em células das três camadas germinativas: ectoderma, mesoderma e endoderma. Entretanto, por razões éticas e de controle celular, o uso destas células é limitado tanto para pesquisas como para uso clínico. Por outro lado, as células-tronco adultas, consideradas multipotentes e encontradas em diferentes tecidos do corpo humano como periósteo, membrana sinovial, músculo, dentes decíduos e cordão umbilical entre outros⁽⁶³⁾; estão sendo extensivamente estudadas e diversos ensaios clínicos empregando estas células, em seres humanos, já foram publicados^(60,64-67). A medula óssea, uma das primeiras fontes de células-tronco estudadas, apresenta em sua estrutura tecidual tanto células-tronco de linhagem hematopoiética como de linhagem mesenquimal.

Em 1968, Friedenstein et al. foram os primeiros pesquisadores a identificar células-tronco mesenquimais no estroma da medula óssea^(68,69). Entretanto, o difícil acesso, a dor na área doadora, assim como o baixo rendimento celular não favoreceram o amplo uso destas células em estudos clínicos^(61,70).

Aproximadamente 30 anos após a publicação de Friedenstein et al., Zuk, Zhu et al. identificaram células-tronco adultas multipotentes no estroma do tecido adiposo, com capacidade de diferenciação adipogênica, osteogênica, condrogênica, miogênica e neurogênica^(58,59). Considerando o enorme potencial terapêutico, estes pioneiros estudos permitiram que pesquisadores de todo o mundo, utilizando protocolos semelhantes de digestão enzimática, isolassem e estudassem as aplicações clínicas das células-tronco derivadas da gordura (CTDG).

Segundo a Sociedade Internacional de Terapia Celular, células-tronco mesenquimais para receber esta denominação, devem possuir algumas características específicas “em cultura”: aderir à superfície plástica do frasco de cultura, à imunofenotipagem possuir os marcadores de superfície CD73, CD90 e CD105 e não apresentar os marcadores CD14, CD34 e CD45. Ainda, em meios de cultura contendo fatores específicos, podem se diferenciar em adipócitos, osteoblastos e condroblastos⁽⁷¹⁾. Entretanto, não existe um antígeno de superfície único e exclusivo que identifique as CTDG e as diferencie das outras células presentes na FVE, que é a região localizada ao redor dos vasos sanguíneos do tecido adiposo^(22,72,73). Ao contrário, a depender do momento (FVE fresca ou em diferentes passagens da cultura celular) em que estas células são analisadas para se estabelecer seu fenótipo, existe uma grande alteração na expressão dos marcadores^(74,75). Dá-se o nome de FVE fresca ao conjunto de células resultante do processo de digestão enzimática do tecido adiposo, isoladas por centrifugação, excluindo-se os adipócitos, antes de serem colocadas em processo de cultivo e expansão.

Yoshimura et al. analisaram o perfil fenotípico das células existentes na FVE fresca do tecido adiposo e concluíram que as CTDG correspondem a aproximadamente 70-90% de todas as células ali presentes e que o perfil fenotípico predominante das CTDG é CD31⁻CD34⁺CD45⁻CD90⁺CD105⁻CD146⁻. As células progenitoras endoteliais correspondem a 5-9% da FVE e outras células como células musculares lisas, pericitos, fibroblastos e células de origem hematopoiética (granulócitos, monócitos/macrófagos e linfócitos) compõem os demais tipos celulares e possuem marcadores de superfície específicos e distintos entre si^(76,77).

Peroni et al. concluíram que as células-tronco mesenquimais do tecido adiposo e da medula óssea apresentam semelhanças fenotípicas e possuem genes que são expressos também por células-tronco embrionárias. Estes achados podem explicar porque as CTDG podem se diferenciar tanto em células do mesoderma como do ectoderma⁽⁷⁰⁾. Achados semelhantes foram encontrados por outros autores⁽⁷⁶⁾.

Inicialmente, as células multipotentes presentes na FVE do tecido adiposo receberam o nome de “células processadas de lipoaspirado” (PLA cells - processed lipoaspirate cells)^(58,59,61), porém após estas células receberem diferentes nomenclaturas⁽⁷⁴⁾ a Sociedade Internacional de Tecnologia Aplicada à Gordura – IFATS, em 2007, chegou a um consenso⁽⁷⁸⁾ e a partir daquele ano estas células passaram a ser chamadas ou de células-tronco derivadas da gordura ou células estromais derivadas da gordura (ADSCs – Adipose Derived Stem/Stromal Cells).

Apesar de o número ser extremamente variável de indivíduo para indivíduo⁽⁷⁹⁾, pode-se obter, após o processo de digestão enzimática, a partir de 1 grama de tecido adiposo obtido por lipoaspiração, uma média de $1,3 \times 10^6$ células da FVE; o que é cerca de 400 vezes maior que o rendimento de células-tronco mesenquimais obtidas a partir da medula óssea^(63,76). Entretanto, este número varia muito entre as diversas publicações, podendo chegar a $7,92 \times 10^6$ células/ml⁽⁸⁰⁾. Estudos mostram que não há relação entre o número de células obtidas por lipoaspiração quando são analisados fatores como a idade e o índice de massa corporal (IMC) e há um consenso de que a porção infra-umbilical do abdome é a região que mais fornece células^(77,80,81). As regiões internas dos joelhos e das coxas apresentam rendimento celular semelhante ao do abdome⁽⁸⁰⁾. Faustini et al.⁽⁷⁷⁾, diferentemente de outros autores⁽²²⁾, encontraram um maior rendimento celular em mulheres e, também, quando o tecido adiposo era obtido através de lipoaspiração.

Considerando a participação das CTDG na reposição de adipócitos senescentes no tecido adiposo adulto, cuja renovação se dá a cada 1 ou 2 anos e, também, à imprevisibilidade da manutenção volumétrica dos enxertos de gordura convencionais, Matsumoto et al.⁽²²⁾ concluíram através de um elaborado estudo, que as CTDG podem participar ativamente do processo de integração e sobrevivência dos enxertos de gordura da seguinte maneira (Figura 2):

- podem se diferenciar em células endoteliais
- as localizadas entre os adipócitos podem colaborar para a reposição deste tipo celular no longo prazo
- podem, agudamente, se diferenciar em adipócitos maduros
- através de ação parácrina, secretar fatores pró-angiogênicos que aceleram a angiogênese, tão necessária na fase isquêmica inicial do enxerto; a partir do leito receptor e também a partir de células precursoras endoteliais presentes na FVE enxertada

Zhu et al. e Lu et al., em diferentes estudos com camundongos atímicos, demonstraram que o enriquecimento de enxertos de gordura com células da FVE em condições supra-fisiológicas, aumentou o peso do enxerto e de sua densidade capilar. Observaram também que as CTDG participaram da constituição do novo tecido adiposo e também da parede de vasos neoformados. Houve maior persistência volumétrica dos enxertos enriquecidos com CTDG previamente transfectadas para aumentar a produção de VEGF^(82,83).

Figura 2: Esquema proposto por Yoshimura e cols.⁽⁸⁴⁾ para as funções das células tronco presentes na FVE do tecido adiposo. Reprodução com autorização da revista *Regenerative Medicine* (Anexo L). Legenda: *adipocyte* – adipócito, *apoptosis* – apoptose, *ECM* – matriz extracelular, *degradation* – degradação, *differentiation* – diferenciação, *enzyme* – enzima, *function* – função, *release* – liberação, *stem progenitor cells* – células tronco progenitoras, *transient amplifying cells* – células amplificadoras transitórias, *vasculature* – vasos sanguíneos

Em ensaio clínico, Tanikawa et al. encontraram maior persistência volumétrica dos enxertos de gordura enriquecidos com as células da FVE fresca (88%), utilizando a técnica desenvolvida por Yoshimura et al.⁽⁸⁵⁾, quando comparados aos enxertos realizados pela técnica Coleman (54%), em pacientes portadores de microssomia hemifacial⁽⁶⁷⁾.

Trojan-Kølle et al. baseados nos resultados de estudos prévios^(82,83), realizaram estudo clínico prospectivo e randomizado, em que pacientes receberam enxertos de gordura em bolo, suplementados numa taxa de 2000 vezes com CTDG

expandidas em cultura celular, na região interna do braço. O braço contralateral recebeu gordura processada apenas com centrifugação e compôs o grupo controle. Após 121 dias, os enxertos foram removidos, pesados e encaminhados para análise histológica e imuno-histoquímica. A média da persistência volumétrica dos enxertos no grupo enriquecido foi de 80,9% e a do grupo controle foi de 16,3%. A análise histológica mostrou que os enxertos suplementados apresentavam maior quantidade de tecido adiposo morfológicamente normal, maior quantidade de tecido conjuntivo neoformado e menor quantidade de necrose⁽⁸⁶⁾.

Estes estudos demonstram que a suplementação dos enxertos de gordura com células-tronco presentes na FVE do tecido adiposo, em diferentes concentrações, aumentam a persistência volumétrica.

3.3 Enxertos de Gordura em Mama, Reconstrução Mamária e Risco Oncológico

O primeiro relato de enxerto de gordura na mama, foi atribuído a Czerny (1895)[§] citado por Billings⁽²⁶⁾, quando transferiu um lipoma do dorso para a correção da sequela de uma mastectomia. Na era pós-lipoaspiração, a primeira tentativa de aumento mamário com gordura foi feita por Bircoll em 1987⁽⁸⁷⁾. Naquele ano, o Comitê de Novos Procedimentos da Sociedade Americana de Cirurgia Plástica e Reconstructora publicou parecer condenando o enxerto de gordura para o aumento estético das mamas, argumentando que grande parte da gordura não sobreviveria

[§] Czerny, A. Plastischer Ersatz der Brustdruse durch ein Lipoma. *Chir. Kongr. Verhandl.* 2:216,1895.

à enxertia e acabaria por provocar cicatrizes e calcificações na mama. Em decorrências destas alterações, a mamografia poderia não detectar a presença de um câncer de mama em estágio inicial e assim, este evoluiria sem o devido diagnóstico⁽⁸⁸⁾. No mesmo ano, 1987, Brown et al. publicaram achados mamográficos após a realização de mamoplastia redutora. Após dois anos da cirurgia, 45% das pacientes apresentavam calcificações e 80% apresentavam alterações arquiteturais retro-areolares e no polo inferior⁽⁸⁹⁾. Entretanto, nenhuma consideração especial foi referenciada à mamoplastia redutora.

O posicionamento infundado da Sociedade Americana de Cirurgia Plástica e Reconstructiva fez com que o tema enxerto de gordura em mamas fosse proibitivo. Até que Coleman e Saboeiro, em 2007, publicaram uma série de 17 pacientes que receberam enxertos de gordura em mamas com diversos diagnósticos clínicos⁽¹³⁾. O volume dos enxertos foi, em média, 278 ml por mama e por sessão com tempo de seguimento médio de 5 anos. Das mamografias realizadas no pós-operatório, 23,5% mostraram calcificações benignas e duas pacientes foram diagnosticadas com câncer de mama.

Outras séries de enxerto de gordura em mamas foram publicadas nos anos subsequentes, mostrando a grande diversidade metodológica no que se refere à obtenção, preparo e transferência da gordura, planos enxertados, condicionamento pré-operatório das mamas, tempo de seguimento, volume de retenção dos enxertos e número de sessões necessárias para atingir um resultado satisfatório^(21,90-95) (Tabela 1). Destacam-se, neste cenário, os trabalhos pioneiros de Yoshimura et al. que realizaram estudos clínicos que empregaram enxertos de gordura enriquecidos com CTDG no aumento estético das mamas e após a remoção de implantes de

silicone^(60,96). Também, de grande importância, o trabalho de Khouri et al. demonstrou que o preparo do leito mamário previamente à enxertia, através da expansão tecidual externa, promove altos índices de retenção volumétrica dos enxertos de gordura⁽⁹³⁾.

Tabela 1: Enxertos de gordura em mamas sadias

AUTORES	N	DIAGNÓSTICOS	SEGUIMENTO MÉDIO (meses)	VOLUME POR SESSÃO POR MAMA(cc)	PLANOS DE ENXERTIA	PREPARO	NECROSE GORDUROSA (%)	MICRO-CALCIFICAÇÕES (%)	MAIS QUE 1 SESSÃO (%)
Coleman e Saboeiro 2007	17	hipomastia, tuberosa, pós-explante, sobre implante	62	278	TCSC, IM peitoral, retro-peitoral e pré-peitoral	centrifugação	11,7	23,5	17,6
Zheng e cols. 2008	66	hipomastia, ptose, pós-explante	37	174	TCSC e pré-peitoral	lavagem c/ SF e centrifugação	16,7	10,6	57,6
Zocchi e Zuliani 2008	181	hipomastia, assimetria, mamoplastia redutora, mastopexia	ao menos 12 meses	375	TCSC e pré-peitoral	decantação e plataforma vibratória	3	3,9	NI
Illouz e Sterodimas 2009	820	hipomastia, alterações congênitas, pós-reconstrução	12 a 132	145	TCSC e intra-parênquima	decantação		BIRADS 0 - 4,5 BIRADS 3 - 17,5 BIRADS 4 e 5 - 0	(1 a 5 sessões) 3 em média
Mu e cols. 2009	140	hipomastia, pós-retirada de enxertos de gordura	6 a 24	120	TCSC, IM peitoral, pré-peitoral e retro-peitoral	VEGF	0,7	NI	0
Kamura e Ito 2011	20	hipomastia	9	240	TCSC, IM peitoral, e retro-peitoral	Celution	5	5	0
Li e cols. 2014	105	hipomastia, tuberosa, assimetria	18	205	TCSC, pré-peitoral, e intra-parênquima	decantação e filtração	2,85	1,9	23,8

Legenda: IM= intra-muscular, Celution= dispositivo que centrifuga e extrai células da fração vâsculo-estromal, TCSC= tecido celular subcutâneo, VEGF= fator de crescimento vâsculo-endotelial, NI= não informado

Complicações podem ocorrer em decorrência da enxertia de gordura na mama e a mais preocupante delas é a necrose gordurosa, que pode se manifestar através de cistos com conteúdo oleoso e nodulações calcificadas. Inúmeros fatores podem estar envolvidos com a ocorrência deste evento, sendo que o principal é a vascularização insuficiente das células enxertadas. Hyakusoku et al.⁽⁹⁷⁾ e Mu et al.⁽²¹⁾ analisando, separadamente, 28 pacientes com complicações decorrentes do enxerto de gordura em mamas, concluíram que este tipo de cirurgia deve ser realizado por cirurgiões experientes e bem treinados, a técnica deve ser levada ao

máximo da perfeição, as pacientes devem ser informadas previamente que alterações na mamografia poderão ser definitivas e que o parênquima mamário deve ser evitado durante a enxertia.

Spear et al.⁽⁸⁾ foram os primeiros autores a aplicar o enxerto de gordura em pacientes com irregularidades de contorno após reconstrução mamária com tecidos autólogos e aloplásticos. Em concordância com outros autores^(98,99), os quadrantes superiores das mamas reconstruídas foram os mais tratados, com o objetivo de atenuar a transição entre a mama e o tórax. Realizaram 47 enxertos, com volume médio de 116 ml e no seguimento médio de 15 meses observaram a ocorrência de necrose gordurosa em 6,8%. Nesta série, 85% das pacientes alcançaram algum grau de melhoria estética sendo que 7% necessitaram de mais de uma sessão de enxertia. Missana et al.⁽¹⁰⁰⁾ realizaram 74 enxertias, com volume médio de 122 ml, em pacientes com irregularidades de contorno após reconstruções de mastectomia e quadrantectomia. Nesta série, 50% das pacientes receberam radioterapia, 6,75% desenvolveram necrose gordurosa e 15% necessitaram de mais de uma sessão de enxertia. Em outras séries, o volume médio de gordura enxertada por sessão ficou entre 30 e 70 ml e, coincidentemente, 25% a 55% destas pacientes necessitaram de mais de uma sessão. Apesar de o volume enxertado ter sido baixo, a incidência de necrose gordurosa ficou entre 6% e 17%^(15,16,98,99). de Blacam e cols. analisaram o efeito da radioterapia em 111 enxertias realizadas em 68 pacientes e concluíram que esta modalidade terapêutica não teve impacto sobre a incidência de complicações e no número de sessões⁽⁹⁹⁾. Doren e cols. em uma análise de 568 enxertos de gordura, demonstraram que diabetes melito, hipertensão arterial e tabagismo não se mostraram como fatores de risco para a

ocorrência de complicações como necrose gordurosa, formação de cistos e infecção⁽¹⁶⁾. Diversos autores se dedicaram a estudar os efeitos do enxerto de gordura em pacientes irradiadas previamente à reconstrução mamária e concluíram que, apesar de um maior número de procedimentos cirúrgicos, os resultados alcançados foram semelhantes aos de pacientes não irradiadas^(11,12,18,101).

Estudo multicêntrico europeu (RESTORE-2) analisou o comportamento de enxertos de gordura suplementados com células da FVE para o tratamento das sequelas do TCCM em 67 pacientes⁽¹⁰⁾. A suplementação dos enxertos foi realizada com a máquina Celution 800 (Cytori, San Diego, California, EUA). Sem grupo controle e sem análise volumétrica, as pacientes foram seguidas por um período mínimo de 12 meses, quando foi realizada a RNM de mamas que detectou a presença de cistos em 68% dos casos. No curto período de seguimento não foi observado nenhum caso de recidiva local do câncer de mama. Gentile et al. em estudo prospectivo controlado, empregando método subjetivo de análise volumétrica, mostrou que enxertos de gordura suplementados com células da FVE apresentaram retenção volumétrica semelhante a de enxertos de gordura enriquecidos com plasma rico em plaquetas, 63% e 69% respectivamente; enquanto que enxertos de gordura convencionais apresentaram retenção de 39%. Neste estudo, houve uma distribuição uniforme das diferentes patologias (congenitas, reconstrução de mama e sequela pós-explante) nos 3 grupos, com tempo máximo de seguimento de 12 meses em que apenas 1 caso apresentou cistos e microcalcificações no estudo radiológico⁽¹⁷⁾. Estes são os dois únicos estudos publicados que utilizaram enxertos de gordura suplementados com células da FVE (produzidos pela máquina Celution 800), em reconstrução mamária.

Em 2009 o enxerto de gordura foi alvo de uma força tarefa da Sociedade Americana de Cirurgiões Plásticos, com ênfase nos enxertos em mamas. Concluíram, avaliando a literatura existente à época, que há falta de estudos clínicos prospectivos e aleatorizados que forneçam dados para a formulação de recomendações grau A. No entanto, puderam concluir que a longevidade dos enxertos é desconhecida e que para a obtenção dos resultados desejados, mais de uma sessão poderá ser necessária e que o volume do enxerto pode variar com o tempo de acordo a variação do peso do paciente (recomendação grau B). A realização de enxertos de gordura em mamas parece não interferir na detecção do câncer de mama, entretanto mais estudos são necessários para confirmar esta impressão (recomendação grau C). E por fim, avaliar e decidir criteriosamente enxertar pacientes consideradas de alto risco, isto é, que apresentem fatores de risco para o desenvolvimento do câncer de mama individuais ou familiares (recomendação grau D)⁽¹⁰²⁾.

Em 2011, as duas principais sociedades americanas de cirurgia plástica (ASAPS – Sociedade Americana de Cirurgia Plástica Estética e a ASPS – Sociedade Americana de Cirurgiões Plásticos) publicaram recomendação sobre os enxertos de gordura suplementados com células tronco⁽¹⁰³⁾.

Enquanto terapias com células-tronco possuem um potencial benéfico em diferentes aplicações médicas, um considerável conjunto de informações clínicas aplicadas à cirurgia plástica necessita, ainda, ser coletado e avaliado. Enquanto mais evidências não estiverem disponíveis, terapias com células-tronco em cirurgia plástica estética e reconstrutiva devem ser realizadas dentro de estudos clínicos aprovados por comitês de ética institucionais.

Em estudo nacional realizado pela Sociedade Americana de Cirurgiões Plásticos, sobre a utilização do enxerto de gordura em mamas⁽¹⁰⁴⁾, foi observado um predomínio dos casos de reconstrução mamária, onde a gordura atua como um coadjuvante na melhoria da forma e do volume tanto na reconstrução com aloplásticos como com tecidos autólogos. Ainda, 62% dos cirurgiões realizam estes enxertos nas sequelas do TCCM. Uma fração menor, utiliza a gordura como técnica de aumento primário das mamas ou para substituir implantes de silicone.

Existe um consenso de que as alterações radiológicas provocadas pelo enxerto de gordura na mama não são piores que as provocadas pela mamoplastia redutora⁽¹⁰⁵⁾. Não existe, entretanto, consenso sobre o processamento, de maneira que a grande maioria ou apenas decanta (45%) ou centrifuga (36%) a gordura. Apesar dos avanços, 59% dos cirurgiões participantes não enxertam e não possuem planos para transplantar gordura nas mamas em qualquer circunstância⁽¹⁰⁴⁾.

Diversos autores analisaram o impacto do enxerto de gordura na ocorrência de recidivas loco-regionais do câncer de mama em pacientes submetidas à reconstrução mamária após mastectomia e após o TCCM⁽¹⁰⁶⁻¹¹²⁾. Rigotti et al., com tempo de seguimento de mais de 5 anos, analisaram a incidência de recidivas loco-regionais, nas mesmas pacientes, antes e depois do enxerto de gordura e encontraram taxa de 0,72% ao ano no período pós- enxertia comparado a 0,91% ao ano no período pré-enxertia⁽¹⁰⁶⁾. Estudo multicêntrico que avaliou 646 enxertias de gordura em 513 pacientes, com tempo de seguimento médio de 19 meses, encontrou taxa de recidiva loco-regional de 1,5% ao ano e de metástases à distância de 1,9% ao ano. Analisando separadamente as pacientes, o grupo das mastectomizadas apresentou

recidiva de 1,38% ao ano enquanto que o grupo do TCCM apresentou recidiva de 2,07% ao ano. Ainda, o grupo das pacientes diagnosticadas com neoplasias intra-epiteliais apresentou recidiva de 2,33% ao ano, enquanto que o grupo das pacientes com carcinomas invasores apresentou 1,44% de recidiva ao ano⁽¹⁰⁸⁾.

Estudo retrospectivo de Petit et al. analisou as taxas de recidiva loco-regionais em 341 pacientes que receberam enxertos de gordura e em 642 do grupo controle. A alocação das pacientes foi realizada de maneira homogênea quanto aos fatores idade, tempo de seguimento após a cirurgia oncológica, tipo de cirurgia oncológica realizada, tipo histológico do tumor, tamanho do tumor, a presença ou não de receptores estrogênicos e tempo de seguimento geral de 56 meses. Encontraram uma taxa de recidiva loco-regional de 1,15% ao ano no grupo que recebeu enxertos de gordura e 1,36% ao ano no grupo controle⁽¹⁰⁹⁾. Riggio et al. encontraram incidência ainda mais baixa de recidiva loco-regional numa série de 60 pacientes submetidas à enxertia de gordura após mastectomia e acompanhadas por 10 anos. A incidência de recidiva loco-regional foi de 0,47% ao ano⁽¹¹¹⁾. Em outra publicação, mais recente, Petit et al. encontraram uma taxa maior de recidiva loco-regional em pacientes jovens, portadoras de neoplasias mamárias (ductal e lobular) intra-epiteliais de alto grau submetidas a enxerto de gordura quando comparadas ao grupo controle⁽¹¹³⁾.

Krastev et al.⁽¹¹⁴⁾ após revisão sistemática sobre a segurança oncológica dos enxertos de gordura em pacientes portadoras de câncer de mama, chamaram a atenção para o fato de que, até o final de 2011, mais de 2000 pacientes já haviam recebido enxertos de gordura nos EUA e Europa e que, no entanto, não havia até aquele momento estudos clínicos prospectivos e aleatorizados que pudessem

fornecer informações de maior evidência científica, mas que as séries de Petit et al.⁽¹⁰⁹⁾ e Rigotti et al.⁽¹⁰⁶⁾ mostraram resultados promissores.

De acordo com Krumboeck et al.⁽¹¹⁵⁾ não está definido ainda qual é a relação entre as células-tronco mesenquimais presentes nos enxertos de gordura e as células tumorais do câncer de mama residuais ou mesmo as quiescentes. Alguns experimentos animais chamaram a atenção para o fato de que a adição de células mesenquimais às células de câncer de mama promoveu um rápido crescimento tumoral e que resultado semelhante ocorreu com a adição de células progenitoras endoteliais^(116,117). Entretanto, outros autores demonstraram que a síntese de substâncias por células-tronco mesenquimais podem inibir o crescimento de células do câncer de mama⁽¹¹⁸⁾ e que, a depender da concentração de células mesenquimais, a angiogênese também pode ser inibida⁽¹¹⁹⁾. Não está definido se os resultados observados em estudos experimentais podem ser aplicados em seres humanos. Deste modo, Casiraghi et al.⁽¹²⁰⁾ revisando publicações que empregaram células-tronco mesenquimais derivadas de medula óssea e do tecido adiposo para tratar patologias em seres humanos, mostraram que esta terapia além de eficaz é segura, não tendo sido observado o desenvolvimento de novos tumores e nem a facilitação do desenvolvimento de tumores já existentes. Em acordo com o posicionamento das sociedades americanas de cirurgia plástica, Pearl et al.⁽¹²¹⁾ recomendam a individualização das pacientes candidatas a enxertos de gordura na mama, com o objetivo de se identificar as pacientes de alto risco e que novas evidências decorrentes de estudos “in vitro” e “in vivo” são necessárias antes de enxertos de gordura suplementados com células da FVE sejam realizados rotineiramente.

4 Método

Este estudo foi conduzido no Ambulatório de Reconstrução Mamária do Hospital Municipal Carmino Caricchio (HMCC), após aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa daquele hospital sob o número 007/10, na data de 25/04/2011, após análise e autorização da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP sob o parecer número 238/2011 e também após a aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – FMUSP sob o número 498/11.

Este estudo clínico, prospectivo e controlado foi também registrado no sítio de registro de estudos clínicos ClinicalTrials.gov sob o número NCT01771913.

Foram recrutadas no Ambulatório de Reconstrução Mamária do HMCC, pacientes que apresentavam irregularidade de contorno da reconstrução mamária após mastectomia, independentemente da técnica empregada: expansor seguido por implante, retalho músculo-cutâneo dos retos abdominais - TRAM, retalho músculo-cutâneo do latíssimo do dorso com implante de silicone e retalho músculo-cutâneo do latíssimo do dorso sem implante.

Foram incluídas pacientes acima de 30 anos, com índice de massa corporal (IMC) entre 20 e 35 kg/m², submetidas ou não à radioterapia e que pudessem apresentar sequelas deste tratamento, até o grau 2 da escala LENT-SOMA⁽¹²²⁾, sem e com comorbidades clínicas desde que compensadas e com tecido adiposo na região do abdome e flancos em quantidade suficiente para a realização do procedimento cirúrgico. Todas as pacientes foram incluídas após a obtenção de

liberação por escrito das equipes de Mastologia e Oncologia Clínica autorizando a realização da cirurgia, demonstrando inatividade da doença mamária. Foram excluídas deste estudo pacientes submetidas ao TCCM e as pacientes portadoras de doenças clínicas descompensadas.

A alocação das pacientes nos dois grupos se deu de forma aleatória em bloco e estratificada, de maneira a distribuir de maneira balanceada pacientes submetidas à radioterapia⁽¹²³⁾, entendida como um fator confundidor. Assim, tão logo o primeiro grupo (grupo tronco) foi completo, o segundo grupo (grupo controle) foi iniciado.

A todas às pacientes foi entregue o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE (Anexo B) aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa da FMUSP.

As pacientes foram distribuídas em 2 grupos distintos para receber enxerto de gordura como a única técnica para correção das irregularidades de contorno. O grupo tronco (**GT**) foi composto por pacientes que receberam enxerto de gordura enriquecido com as células presentes na FVE do tecido adiposo do abdome e flancos. O grupo controle (**GC**) foi composto por pacientes que receberam enxerto de gordura centrifugada sem enriquecimento. Todas as informações, de cada paciente de ambos os grupos foram transferidas para a ficha de coleta de dados (Anexo C).

4.1 Cálculo Amostral

O cálculo amostral foi realizado supondo que a persistência volumétrica promovida pela nova técnica de enriquecimento dos enxertos de gordura seria de 80% e que as táticas existentes para a realização de enxerto de gordura produzem

uma integração média de 50%. Foi utilizada uma variância de 20% e um coeficiente de erro alfa de 5%. O programa utilizado para o cálculo amostral foi o STATISTICA, versão 12 (StatSoft Inc., Tulsa, EUA) e o número de indivíduos atribuídos, pelo programa, para cada grupo foi de 9 indivíduos.

4.2 Avaliação Pré-operatória

Todas as pacientes receberam as devidas informações sobre a intervenção cirúrgica a que seriam submetidas e a existência dos grupos do estudo, entretanto não foram informadas a qual grupo seriam alocadas. Após aferição do peso e altura, as pacientes foram encaminhadas para a realização de exames laboratoriais, eletrocardiograma, radiografia do tórax, avaliações cardiológica e anestesiológica.

Estando aptas, as pacientes foram submetidas a exames de RNM das mamas sem contraste, no período pré-operatório e, ao menos, 6 meses após a cirurgia; com o objetivo único e se calcular o volume mamário (Figura 3). As pacientes foram fotografadas em 5 posições (frente, oblíqua e perfil direitas e oblíqua e perfil esquerdas) antes da cirurgia e depois com 6 e 12 meses.

Figura 3: Bobina utilizada no exame de RNM das mamas

4.3 Cirurgia

Todas as cirurgias foram realizadas sob anestesia geral no HMCC e todas as pacientes foram operadas pelo mesmo cirurgião; o autor desta tese. Em posição ortostática e imediatamente antes de as pacientes serem anestesiadas, tanto as regiões doadoras como as receptoras foram marcadas com caneta dermatográfica e fotografias foram obtidas.

A marcação, nas mamas a serem enxertadas, foi disposta em quadrantes e uma ficha análoga foi criada para a anotação dos volumes enxertados em cada quadrante (Figura 4 e anexo D).

Figura 4: **A:** marcação pré-operatória dos quadrantes da mama esquerda e da mamoplastia redutora de simetrização da mama direita; **B:** diagrama para anotação dos volumes enxertados em cada quadrante

Após rotineira antissepsia e assepsia com clorexidina, colocação de campos cirúrgicos estéreis, o tecido adiposo subcutâneo das regiões do abdome e flancos foi infiltrado com solução composta por soro fisiológico e adrenalina na concentração de 1:500.000. Decorridos 15 minutos, a gordura foi obtida com cânula de lipoaspiração de 3,0 mm de diâmetro e 25 cm de comprimento com 3 furos na ponta (Richter, São Paulo, Brasil), conectada a um aspirador, sob pressão negativa de 350 mmHg (Sales, São Paulo, Brasil)⁽⁷⁹⁾. A gordura, coletada em um intermediário estéril (Avazamm, Zammi, Duque de Caxias, Brasil), foi manuseada em condições completamente estéreis.

Após coletada, a gordura era transferida para tubos plásticos cônicos, do tipo Falcon (BD, Curitiba, Brasil), de 50 ml e introduzidos em uma centrífuga (Centribio 80-2B, Guangzhou, China) com capacidade para 6 tubos, em caçapas também estéreis. Após centrifugação por 2 minutos a uma FCR de 335 g, os tubos eram retirados da centrífuga e tanto o óleo como a solução de infiltração eram removidos com o auxílio de pipetas e de uma micro-cânula de 2,0 mm de diâmetro (Richter, São Paulo, Brasil) (Figura 5).

Figura 5: A: tubos de 50 ml contendo gordura, antes da centrifugação, B: rotor da centrífuga com caçapas e C: tubos contendo gordura, após a centrifugação

No GC, o volume médio de gordura aspirado foi de 400 cc. Após a centrifugação e preparo, a gordura era transferida dos tubos para seringas de 60 cc e destas, através de um transferidor Luer-Luer (Richter, São Paulo, Brasil), para seringas de 3 cc.

No grupo tronco GT, 900 ml de gordura eram obtidos para a realização do enriquecimento 2:1. Um terço da gordura obtida, 300 ml, recebia o mesmo tratamento da gordura do GC. Os dois terços remanescentes, 600 ml, após centrifugação inicial por 2 minutos a uma FCR de 335 g, eram utilizados para a obtenção das células presentes na FVE de acordo com protocolo adaptado da publicação original⁽⁵⁹⁾ e detalhado a seguir (Figuras 6 e 7):

- transferência de 40cc da gordura centrifugada para seringas com rosca de 60 cc (BD, Curitiba, Brasil)
- adição de 20 cc de collagenase tipo IA na concentração 1,5 mg/ml (Sigma Aldrich, Hannover, Alemanha)
- colocação destas seringas em um recipiente estéril, contendo soro fisiológico aquecido, dentro do banho-maria (Banho Maria modelo Q215M2, Quimis, São Paulo, Brasil), a 37 °C, por 30 minutos, com homogeneização manual frequente
- das seringas, a fase mais densa foi escorrida em tubos plásticos cônicos de 50 ml e a gordura remanescente foi novamente centrifugada para otimizar a obtenção da porção fluída
- a collagenase presente na porção fluída foi inativada com a solução salina balanceada de Hank (GIBCO, Life Technologies, Grand Island, EUA) na proporção 1:3

- distribuição do volume total em tubos plásticos cônicos de 15 ml que foram submetidos a centrifugação por 5 minutos a uma FCR de 750 g
- descarte do sobrenadante visualizando-se aglomerados de células aderidas ao fundo de cada tubo cônico, que foram coletados com pipetas
- todos os aglomerados foram colocados na gordura a ser enxertada, que serviu como matriz, dentro de uma bolsa de sangue de transferência estéril (Bolsa de sangue de transferência, sem anticoagulante, Fresenius Kabi, São Paulo, Brasil); onde permaneceram por 10 minutos sob contínua homogeneização
- 2 alíquotas de gordura, antes e depois do enriquecimento, foram enviadas ao laboratório para processamento

Figura 6: **A:** mesa cirúrgica adaptada para esta cirurgia, **B:** gordura sob digestão enzimática em banho-maria, **C:** aspecto da gordura após a digestão enzimática e **D:** a gordura centrifugada (matriz) já enriquecida com as células da FVE em uma bolsa de sangue, de transferência (ausência de anticoagulantes), pronta para ser enxertada

ENRIQUECIMENTO 2:1 – ILUSTRAÇÃO ESQUEMÁTICA

Figura 7: Esquema do preparo da gordura enriquecida na proporção 2:1. A gordura aspirada é dividida em 3 partes iguais. Duas partes para a obtenção das células da FVE através do processo de digestão enzimática e uma parte para se obter a gordura matriz. Adaptado de figuras do artigo de Yoshimura et al. com autorização da revista *Regenerative Medicine* (Anexo L)

O tempo de preparo do enxerto de gordura, na sala de cirurgia, foi definido como o tempo decorrido entre o início da lipoaspiração e o início da enxertia da gordura.

A gordura, tanto no GC como no GT, foi enxertada nas áreas previamente demarcadas utilizando-se uma micro-cânula de 1,4 mm de diâmetro e 13 cm de comprimento com um furo na ponta (Richter, São Paulo, Brasil), acoplada a uma seringa de 3 ml. A enxertia era realizada durante o movimento de retirada da micro-cânula, em múltiplas passadas, através de múltiplos portais confeccionados com uma agulha hipodérmica de 40 x 1,2 mm, permitindo o entrecruzamento dos túneis e aumentando a quantidade de gordura enxertada no leito receptor. Traves de fibrose, quando existentes, eram perfuradas inúmeras vezes utilizando-se uma agulha hipodérmica de 40 x 1,2 mm⁽¹²⁴⁾. O volume enxertado em cada quadrante foi devidamente anotado no diagrama esquemático (Figura 4). Os portais da lipoaspiração foram suturados empregando-se fio de nylon 6-0. Ao término da cirurgia a paciente foi encaminhada à sala de recuperação anestésica e depois para a enfermaria, de onde recebeu alta no primeiro dia pós-operatório.

4.4 Análise Laboratorial

Amostras de gordura de todas as pacientes foram enviadas, em bolsas contendo gelo, ao laboratório para a realização de contagem celular e da imunofenotipagem. Parte dos biomédicos envolvidos no processo da imunofenotipagem não tinham nenhuma participação no procedimento cirúrgico e desconheciam a qual grupo a gordura analisada pertencia.

Para a realização destes testes, as amostras de gordura sofreram o mesmo processo de digestão enzimática realizada na sala de cirurgia. Assim, as amostras

foram lavadas 3 vezes com solução salina tamponada com fosfatos (PBS - Phosphate Buffered Saline - 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, GIBCO, Life Technologies) e digeridas com collagenase IA a 0,15% (Sigma Aldrich, Hannover, Alemanha). Após a obtenção e coleta do aglomerado de células (pellet) oriundas da FVE, tiveram início os procedimentos descritos abaixo.

O método utilizado para a análise de viabilidade celular foi o método de exclusão do azul de tripan: uma alíquota do total de células do pellet foi incubada com o mesmo volume de azul de tripan a 0,2% por 5 minutos e depois lavadas com PBS. A contagem celular foi realizada utilizando-se um contador celular automático (Countess I, InVitrogen, California, EUA) que identifica e conta separadamente as células que estão com o citoplasma corado com o azul (células mortas) e as que são translúcidas (células vivas). No GT, o teste de viabilidade celular e a contagem celular foram realizados nas duas amostras de gordura: antes e depois do enriquecimento com as células da FVE. No GC, o teste de viabilidade celular e a contagem celular foram realizados em uma única amostra.

A determinação do fenótipo das diferentes células presentes na FVE fresca das amostras de gordura tanto do GC como do GT, foi realizada através da citometria de fluxo utilizando anticorpos contra os seguintes marcadores de superfície: CD29, CD31, CD34, CD73, CD90 e CD105 (BD Biosciences, New Jersey, EUA). O CD29 é um marcador de adesão celular, o CD31 é um marcador de células de linhagem endotelial, o CD34 é um marcador de células-tronco multipotentes, os CD73, CD90 e CD105 são marcadores de células-tronco mesenquimais.

As células contidas nos aglomerados celulares foram lavadas uma vez com PBS e ressuspensas em 100 µl da mesma solução salina. Anticorpos específicos

para cada epítopo analisado foram incubados junto às amostras de células por 1 hora a 4°C. As células foram novamente lavadas com PBS e prontamente fixadas em para-formaldeído (PFA) a 1% até o momento da análise. As células marcadas com anticorpos não conjugados foram incubadas novamente com um anticorpo secundário por 1 hora a 4°C e novamente lavadas com PBS antes da fixação com PFA. A análise foi realizada avaliando-se sempre 5×10^3 eventos para cada anticorpo e o citômetro utilizado foi o Guava EaseCyte plus (Millipore Corporation, Massachussets, EUA) com os programas Guava ExpressPro 8.1 (Millipore, Massachussets, EUA) e Prisma GraphPad 5 (GraphPad Software, La Jolla, EUA) para a interpretação dos resultados e confecção dos gráficos de expressão, em porcentagem; conforme protocolo estabelecido pelo Laboratório de Genética do Desenvolvimento, do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo⁽⁸¹⁾.

4.5 Volumetria Mamária

A volumetria mamária foi realizada a partir de exames de RNM das mamas, sem a utilização de contraste, em equipamento Phillips, modelo Inthera de 1,5 Tesla (Phillips, Amsterdã, Holanda) utilizando-se bobina específica para o exame de mamas (Figura 3) e sequências sagitais e axiais foram obtidas em T1, T2 e supressão de silicone - sequência em que as cápsulas de vitamina E (marcadores externos) ficam mais evidentes e os limites da mama mais facilmente identificáveis (Figura 8).

Figura 8: **A:** reconstrução tridimensional do tórax gerada pelo programa OsiriX® contendo uma mama reconstruída com implante evidenciando os marcadores externos, **B:** reconstrução tridimensional do tórax gerada pelo programa OsiriX® contendo uma mama reconstruída com TRAM, **C:** um corte axial evidenciando os marcadores que determinam os limites medial e lateral da mama e **D:** demarcação de uma área de interesse no programa OsiriX® (ROI – region of interest)

Imediatamente antes da realização da RNM e com a paciente em posição ortostática, a mama teve seus limites, em 360 graus, demarcados com caneta dermográfica pelo médico pesquisador. Em seguida, as cápsulas de vitamina E foram fixadas à pele, com Transpore® (3M, Sumaré, Brasil), exatamente sobre a linha de demarcação (Figura 9). A medição do volume das mamas foi realizada utilizando-se o programa OsiriX® (Pixmeo, California, EUA), versão gratuita de 32 bits, empregando-se a ferramenta para segmentação de imagens, sobre os cortes

gerados nas sequências axiais; as quais se mostraram mais adequadas para a delimitação das áreas de interesse⁽¹²⁵⁾. **Persistência volumétrica** é a porcentagem de volume que foi retido em relação ao volume total que foi enxertado.

Figura 9: A: demarcação dos limites da mama com caneta dermatográfica e B: posicionamento das cápsulas de vitamina E fixadas com fita adesiva transparente

Uma média de 35 áreas de interesse foram demarcadas em cada análise volumétrica. O programa, a partir das áreas de interesse demarcadas, ao mesmo tempo que realiza uma reconstrução tridimensional, calcula o volume desta reconstrução. A análise volumétrica foi realizada em duplicata por um radiologista independente e a média foi estabelecida como o volume mamário final; tanto nas ressonâncias pré-operatórias como nas pós-operatórias. O produto da reconstrução

tridimensional, na maioria dos casos, é muito semelhante ao aspecto da mama ao exame físico, ainda que as pacientes realizem este exame em decúbito ventral horizontal e com as mamas dentro das cavidades da bobina (Figura 10).

Figura 10: **A e B:** foto de frente e oblíqua esquerda de paciente com reconstrução da mama esquerda com retalho TRAM, **C:** reconstrução tridimensional da mama reconstruída, a partir de todos os cortes da sequência axial e **D:** reconstrução tridimensional com cálculo volumétrico da mama esquerda da mesma paciente, realizada pelo programa OsiriX® a partir das áreas de interesse selecionadas na sequência axial do exame de RNM

4.6 Avaliação da satisfação pelas pacientes

Com o objetivo de avaliar a satisfação das pacientes com o enxerto de gordura na mama reconstruída, ao menos com 6 meses de pós-operatório, foi fornecido um “Questionário de Satisfação” contendo 5 perguntas, adaptadas da publicação de Alderman et al.⁽²³⁾, um ítem Likert (escala analógica visual) e uma escala de valores de 1 a 10 em que a paciente deveria atribuir uma nota ao enxerto de gordura que fora realizado com o objetivo de melhorar a simetria entre as mamas (Anexo E). Os questionários foram enviados pelo correio já com envelope selado para o retorno do mesmo de maneira imediata e sem propiciar custos às pacientes.

4.7 Avaliação por cirurgiões plásticos

Painéis fotográficos contendo fotos de pré e pós-operatório com um mínimo de 6 meses da cirurgia, de cada paciente, distribuídas de maneira aleatória e anônima entre os dois grupos (Figura 11), foram avaliados por 5 cirurgiões plásticos com diferentes vivências e experiências em reconstrução mamária. A análise pelos cirurgiões foi realizada de maneira individual, independente e anônima. Na entrevista pré-avaliação, cada avaliador recebeu uma breve explicação sobre o estudo, as cirurgias realizadas e foi orientado a analisar a presença ou ausência de melhora do contorno apenas e tão somente da mama reconstruída, desconsiderando a mama sadia e o fator simetria mamária. A ficha de avaliação dos 19 casos, permitiu aos avaliadores dar 5 notas: piorou muito, piorou pouco, nada mudou,

melhorou pouco e melhorou muito (Anexo F). A cada nota foi atribuído um valor numérico: -2, -1, 0, 1 e 2, respectivamente. Para cada paciente foram somadas as notas fornecidas pelos cinco avaliadores com o intuito de resumir a opinião destes e permitir uma análise comparativa entre os grupos.

Figura 11: Painel fotográfico contendo fotos de pré e pós-operatório, dos dois grupos, distribuídas de maneira anônima e aleatória

4.8 Análise Estatística

A análise estatística de todas as informações coletadas nesta pesquisa foi inicialmente feita de forma descritiva, através da média, mediana, valores mínimo e máximo, desvio-padrão, frequências absoluta e relativa (porcentagem), além de gráficos de dispersão unidimensional, bidimensional e de barras.

As análises inferenciais empregadas com o intuito de confirmar ou refutar evidências encontradas na análise descritiva foram:

- Teste t-Student para amostras independentes⁽¹²⁶⁾ ou Mann-Whitney⁽¹²⁷⁾ na comparação dos grupos (tronco, controle) segundo:
 - idade (anos), índice de massa corporal (kg/m^2), volumetria (cm^3), volume enxertado (ml), persistência volumétrica (%), celularidade basal e tempo de seguimento (meses)
 - nota da reconstrução mamária (pergunta 6 do questionário de satisfação do enxerto)
 - quantidade dos marcadores celulares (CD29, CD31, CD34, CD45, CD73, CD90, CD105)
 - soma das notas dos cinco avaliadores quanto ao resultado estético da cirurgia
- Wilcoxon⁽¹²⁷⁾ na comparação da celularidade basal e após o enriquecimento no grupo tronco
- Exato de Fisher ou sua extensão⁽¹²⁸⁾ na comparação do perfil dos grupos (tronco, controle) segundo:
 - presença de esteatonecrose e realização de radioterapia
 - respostas às perguntas 2, 3, 4 e 7 do questionário de satisfação do enxerto
- Coeficiente de correlação linear de Pearson⁽¹²⁶⁾ entre persistência volumétrica e marcadores celulares (CD29, CD31, CD34, CD45, CD73, CD90, CD105)
- Coeficiente de concordância Kappa⁽¹²⁸⁾ na quantificação da concordância entre os cinco avaliadores quanto ao resultado estético da cirurgia

Em todas as conclusões obtidas através das análises inferenciais foi utilizado o nível de significância alfa igual a 5%.

Os dados foram digitados em planilhas do Excel 2010 for Windows para o adequado armazenamento das informações. As análises estatísticas foram realizadas com o programa estatístico R versão 2.15.2.

5 Resultados

A amostra selecionada nesta pesquisa foi composta por 19 pacientes, sendo 11 (57,9%) pertencentes ao **GT** e 8 (42,1%) ao **GC** (ver detalhes na Tabela 2 e no Anexo G) e os tipos histológicos dos tumores removidos à época das mastectomias se encontram representados no gráfico 1.

Tabela 2: Dados demográficos das pacientes dos dois grupos (GT e GC)

		tronco (n=11)	controle (n=8)	total (n=19)	p
idade (anos)	média	49,6	49,8	49,7	0,977 ^a
	mediana	49	50	49	
	mínimo-máximo	41-58	36-69	36-69	
	desvio-padrão	5,7	11,5	8,3	
IMC (kg/m ²) antes	média	26,3	25,9	26,1	0,765 ^a
	mediana	25,6	25,2	25,6	
	mínimo-máximo	23,5-30,9	20,8-32,4	20,8-32,4	
	desvio-padrão	2,4	3,5	2,8	
IMC (kg/m ²) depois	média	26,4	26,2	26,3	0,861 ^a
	mediana	25,8	25,6	25,8	
	mínimo-máximo	23,3-29,7	20,4-32,6	20,4-32,6	
	desvio-padrão	2,2	3,8	2,9	
tempo entre as ressonâncias (meses)	média	14,5	12,9	13,8	0,414 ^a
	mediana	15	12	13	
	mínimo-máximo	nov/19	jul/19	jul/19	
	desvio-padrão	2,5	4,8	3,6	
radioterapia	fez	8 (72,7%)	5 (62,5%)	13 (68,4%)	>0,999 ^c
	não fez	3 (27,3%)	3 (37,5%)	6 (31,6%)	

^at-Student para amostras independentes, ^cExato de Fisher

Os dados das volumetrias antes e depois da enxertia, dos volumes de gordura enxertados, das persistências volumétricas, das celularidades basais de

ambos os grupos (**GT** e **GC**) com os respectivos cálculos de significância estatística estão apresentados na tabela 3 e nos anexos G e H.

Gráfico 1: Incidência dos diversos tipos tumorais nos grupos tronco e controle. Legenda: CDI = carcinoma ductal invasivo, CDIS = carcinoma ductal in situ, CLI = carcinoma lobular invasivo, Medular = carcinoma medular, Mucinoso = carcinoma mucinoso, Não-Tumor = sequela de mastite

No **GT**, a média de gordura digerida foi de 322 ml (variação de 240 a 400 ml) e o tempo médio de preparo foi de 165 minutos (variação de 140 a 210 min). Assim, no **GT**, a velocidade média de preparo foi de 2 ml/min, para preparar a gordura enriquecida na proporção 2:1 e no **GC**, o tempo médio de preparo foi de 2,5 ml/min para preparar a gordura sem enriquecimento.

No **GT**, o tempo médio de seguimento das pacientes, desde o enxerto até o exame de ressonância magnética de controle, foi de 14,5 meses, variando de 11 a 19 meses, com desvio-padrão de 2,5 meses e o tempo médio de seguimento clínico da cirurgia de enxertia até a última consulta foi de **36 meses**. O tempo médio de

seguimento das pacientes do **GC**, desde o enxerto até o exame de ressonância magnética de controle foi de 12,9 meses, variando de 7 a 19 meses, com desvio-padrão de 4,8 meses e o tempo médio de seguimento clínico da cirurgia de enxerto até a última consulta foi de **16 meses** (Anexo I).

Tabela 3: Análise quantitativa e qualitativa dos enxertos de gordura dos dois grupos (GT e GC)

		tronco (n=11)	controle (n=8)	total (n=19)	p
volumetria antes (cm ³)	média	650,1	562,8	613,3	0,359 ^a
	mediana	630,5	578	623,2	
	mínimo-máximo	254,1-1048,1	253,3-785,2	253,3-1048,1	
	desvio-padrão	206,8	187,7	198,5	
volumetria depois(cm ³)	média	766,3	618,2	703,9	0,225 ^a
	mediana	735,4	631,8	678,9	
	mínimo-máximo	377,7-1454,6	290,2-861,3	290,2-1454,6	
	desvio-padrão	287,4	194,6	257,4	
volume enxertado (cc)	média	134,3	111,5	124,7	0,175 ^a
	mediana	141	109,5	117	
	mínimo-máximo	45-180	75-147	45-180	
	desvio-padrão	40,9	22,8	35,5	
persistência volumétrica (%)	média	78,9	51,6	67,4	0,310 ^b
	mediana	69,1	51,9	68,2	
	mínimo-máximo	-27,3 a 276,5	27,6 a 72,9	-27,3 a 276,5	
	desvio-padrão	74,9	18,4	58,6	
celularidade basal	média	524760,0*	893125	688477,8	0,829 ^b
	mediana	175000	184000	184000	
	mínimo-máximo	21600-2500000	76000-4200000	21600-4200000	
	desvio-padrão	791542,2	1470988,4	1121673,6	

*estimado com 10 pacientes do grupo tronco

^at-Student para amostras independentes, ^bMann-Whitney

No **GC**, 5 (62,5%) pacientes fizeram radioterapia e nenhuma apresentou esteatonecrose. No **GT**, 8 (72,7%) pacientes fizeram radioterapia e esteatonecrose ocorreu em 4 (36,4%) pacientes (Gráficos 2 e 3). Das 4 pacientes que apresentaram esteatonecrose, 3 foram submetidas a procedimento cirúrgico para a remoção das áreas endurecidas e 1 está há mais de 2 anos em acompanhamento clínico e com

exame seriados de ultrassom, sem demonstrar qualquer alteração da lesão. Os exames anatomopatológicos diagnosticaram necrose gordurosa nos 3 casos. Uma paciente apresentou 2 cistos oleosos no pós-operatório de 2 semanas, nos quadrantes mediais (1 no superior e 1 no inferior) que foram puncionados e tiveram resolução completa com esta conduta, o que foi demonstrado com exame de ultrassom da mama.

Gráfico 2: 72,7% das pacientes fizeram radioterapia no GT e 62,5% no GC ($p>0,999$)

Gráfico 3: Houve 36,4% de esteatonecrose no GT e 0% no GC ($p=0,103$)

Incidência de Esteatonecrose nos Grupos Tronco e Controle

Na comparação entre os grupos tronco (**GT**) e controle (**GC**), temos que ambos os grupos apresentam perfis semelhantes quanto à idade ($p=0,977$), IMC antes ($p=0,765$) e depois ($p=0,861$), volumetria antes ($p=0,359$) e depois ($p=0,225$), volume enxertado ($p=0,175$), **persistência volumétrica ($p=0,310$)**, celularidade basal ($p=0,829$), tempo de seguimento ($p=0,414$), presença de esteatonecrose ($p=0,103$) e realização de radioterapia ($p>0,999$).

Removendo-se 2 pacientes (pacientes 1 e 6 – Anexo G) do **GT** que apresentaram volumetrias discrepantes em relação as demais pacientes do grupo, no item “**persistência volumétrica**”, os cálculos com os novos valores de média (68,7%) e desvio-padrão (24,5%) também não demonstraram diferença estatisticamente significativa entre os grupos tronco e controle ($p = 0,128$).

A técnica mais utilizada no primeiro tempo da reconstrução mamária, nos dois grupos (GT + GC), foi o retalho músculo-cutâneo do latíssimo do dorso com implante de silicone seguido pela reconstrução utilizando a sequência expensor-implante de silicone. O retalho TRAM foi utilizado em apenas 2 pacientes do GT. Em 3 pacientes, de ambos os grupos, em que, previamente, houve explante por infecção; a reconstrução primária utilizada foi o retalho músculo-cutâneo do latíssimo do dorso. Uma paciente pertencente ao GT apresentava sequela de mastite ocorrida na juventude sem qualquer técnica de reconstrução mamária prévia (Gráfico 4).

Gráfico 4: Distribuição dos diferentes tipos de reconstrução nos dois grupos

Houve grande variabilidade no número de células presentes na FVE entre as pacientes de ambos os grupos (Tabela 3 e Gráfico 5). No **GT**, a suplementação média alcançada com a metodologia 2:1 foi de 2,6 vezes (1,38 a 4,44 vezes) (Anexo H) e este método de enriquecimento celular promoveu um aumento significativo da celularidade em todas as pacientes desse grupo ($p=0,005$).

Gráfico 5: Diagrama de dispersão unidimensional da celularidade basal das pacientes dos grupos tronco e controle (cada “o” representa uma paciente)

A análise da expressão de alguns marcadores de superfície pelas células presentes na **FVE fresca** isolada do tecido adiposo das pacientes dos dois grupos mostrou pequenas diferenças. No **GT**, das 11 amostras enviadas para a realização da imunofenotipagem, 4 apresentaram problemas técnicos e apenas 7 amostras puderam ser adequadamente analisadas. No **GC**, das 8 amostras enviadas para análise, 4 apresentaram problemas técnicos e apenas 4 puderam ser analisadas. Foram analisadas as expressões dos marcadores CD29, CD31, CD34, CD45, CD73, CD90 e CD105 e os valores mostram o percentual de células que expressam estes marcadores. Estes dados estão expressos na tabela 4 e no anexo J.

Assim, o perfil imunofenotípico predominante do conjunto de células presentes na FVE fresca do tecido adiposo das pacientes deste estudo é: CD29⁺CD31^{low}CD34^{low}CD45⁻CD73^{low}CD90⁺CD105^{low}.

Tabela 4: Medidas-resumo dos marcadores celulares (CD29, CD31, CD34, CD45, CD73, CD90 e CD105) das pacientes dos grupos tronco e controle

	CD29 (%)	CD31* (%)	CD34* (%)	CD45 (%)	CD73 (%)	CD90 (%)	CD105 (%)
tronco							
n	7	7	5	7	7	7	7
média	70,09	20,56	43,92	8,59	40,36	79,01	35,81
mediana	80,54	0,74	18,64	1,60	39,78	81,00	35,52
mínimo	21,78	0,00	11,00	0,00	0,00	58,86	0,00
máximo	94,90	65,92	92,30	32,50	88,88	96,66	89,78
desvio-padrão	28,34	28,86	41,39	12,38	33,55	15,37	30,11
controle							
n	4	4	4	4	4	4	4
média	75,37	33,34	38,94	15,42	28,84	26,99	36,71
mediana	73,88	31,78	45,23	0,30	28,30	24,09	33,88
mínimo	56,48	20,90	0,00	0,00	26,54	1,38	0,00
máximo	97,24	48,90	65,30	61,08	32,20	58,38	79,08
desvio-padrão	19,69	12,01	28,20	30,44	2,44	27,95	32,45
Total							
n	11	11	9	11	11	11	11
média	72,01	25,20	41,71	11,07	36,17	60,09	36,14
mediana	80,54	20,90	38,32	0,62	28,86	61,82	34,60
mínimo	21,78	0,00	0,00	0,00	0,00	1,38	0,00
máximo	97,24	65,92	92,30	61,08	88,88	96,66	89,78
desvio-padrão	24,60	24,18	34,09	19,54	26,66	32,64	29,33
p	0,751 ^a	0,315 ^b	0,905 ^b	0,527 ^b	0,400 ^a	0,026^a	0,964 ^a

^at-Student para amostras independentes, ^bMann-Whitney

A análise dos resultados revelou que, com exceção do marcador CD90, em que o **GT** apresentou maior medida quando comparado ao **GC** ($p=0,026$) (Gráfico 6), os demais marcadores apresentaram a mesma expressão entre os grupos: CD29 ($p=0,751$), CD31 ($p=0,315$), CD34 ($p=0,905$), CD45 ($p=0,527$), CD73 ($p=0,400$) e CD105 ($p=0,964$).

Conforme sugerem os gráficos apresentados na figura 12, existe uma correlação crescente entre os marcadores CD31, CD73, CD90 e CD105 e a persistência volumétrica. Para os demais marcadores não há evidência visual de qualquer tipo de correlação com a persistência volumétrica.

Gráfico 6: Diagrama de dispersão unidimensional do marcador celular CD90 (%) das pacientes dos grupos tronco e controle (cada “o” representa uma paciente)

Figura 12: Gráficos de dispersão bidimensional evidenciando correlação crescente entre os marcadores CD31, CD73, CD90 e CD105 e a persistência volumétrica

Conforme resume a Tabela 5, as estimativas dos coeficientes de correlação linear de Pearson (r) entre cada marcador celular e a persistência volumétrica revelaram correlação crescente e estatisticamente significativa apenas para o marcador CD90 ($r=0,651$ e $p=0,030$).

Tabela 5: Estimativas dos coeficientes de correlação linear de Pearson entre persistência volumétrica e cada marcador celular

	n	coeficiente de correlação linear de Pearson	p
persistência volumétrica x CD29	11	-0,271	0,420
persistência volumétrica x CD31	11	0,102	0,766
persistência volumétrica x CD34	9	0,052	0,895
persistência volumétrica x CD45	11	-0,091	0,790
persistência volumétrica x CD73	11	0,110	0,747
persistência volumétrica x CD90	11	0,651	0,030
persistência volumétrica x CD105	11	0,307	0,358

Com relação ao grau de satisfação das pacientes ao avaliarem a sua reconstrução através da ferramenta “Questionário de Satisfação” (Anexo E), obtivemos os seguintes resultados, pormenorizados no Anexo K. Todas as pacientes de **ambos os grupos** escolheriam fazer a reconstrução mamária (pergunta 1) e receberam informações suficientes à respeito do enxerto de gordura que lhes permitiram tomar a decisão de fazer a cirurgia de refinamento de sua reconstrução mamária (pergunta 5).

A maioria das pacientes de ambos os grupos escolheria se submeter ao procedimento de enxerto de gordura para melhorar o resultado de sua reconstrução mamaria (pergunta 2), está satisfeita com o resultado do enxerto de gordura em sua mama reconstruída (pergunta 3) e recomendaria o enxerto de gordura para uma amiga que está buscando melhorar o resultado de sua reconstrução mamária (pergunta 4).

Quando investigadas sobre a nota que dariam para a sua reconstrução mamária (pergunta 6), temos que no **GT**, esta nota variou de 5 a 10, enquanto que

no **GC**, variou de 8 a 10. Evidenciando que há uma tendência de as pacientes do **GC** estarem mais satisfeitas que as pacientes do **GT** ($p=0.075$).

De modo geral, quando investigadas sobre o grau de satisfação com o resultado atual de sua reconstrução mamária (pergunta 7), 2 (18,2%) pacientes do **GT** não tinham opinião formada (responderam nem insatisfeita, nem satisfeita) e 9 (81,8%) declararam estar satisfeitas ou muito satisfeitas. No **GC**, 1 paciente declarou estar insatisfeita e 7 (87,5%) declararam estar satisfeitas ou muito satisfeitas (gráfico 7).

A análise destes resultados confirmou que a satisfação das pacientes do **GT** e do **GC** foi estatisticamente semelhante quanto às respostas das perguntas 2 ($p>0,999$), 3 ($p=0,603$), 4 ($p=0,546$) e 7 ($p=0,520$).

Gráfico 7: Distribuição da resposta das pacientes dos grupos tronco e controle para a pergunta 7 (Considerando o enxerto de gordura, demonstre o grau de satisfação com o resultado atual de sua reconstrução mamária) do Questionário de Satisfação

Avaliação do Grau de Satisfação com o Resultado da Reconstrução Mamária

A avaliação dos resultados pelos 5 cirurgiões plásticos mostrou grande variação tanto na avaliação de pares de avaliadores como na avaliação entre todos os avaliadores: coeficiente de concordância Kappa generalizado (para quando há mais de 2 avaliadores) e desta forma as avaliações “piorou muito” e “piorou pouco” foram agrupadas como apenas “piorou” e recebeu nota -1, as avaliações “melhorou pouco” e “melhorou muito” foram agrupadas como apenas “melhorou” e recebeu nota +1 e, por fim, a avaliação “nada mudou” persistiu desta maneira e com a nota 0.

No **GT**, a maioria dos avaliadores escolheu a opção melhorou e a minoria as opções nada mudou e piorou. No **GC** a minoria dos avaliadores escolheu a opção piorou. Para o avaliador 3, a maioria das pacientes não teve nenhuma mudança (nada mudou), para o avaliador 4 todas as pacientes apresentaram alguma melhora (melhorou) e para os demais, a maioria das pacientes foi classificada como nada mudou ou melhorou.

Desta forma, a maioria dos avaliadores não concordou nas classificações nos dois grupos uma vez que os respectivos intervalos de confiança para o coeficiente de concordância Kappa contém o valor zero ou apresentam seus limites inferior e superior negativos. Como exceções, os avaliadores 3 e 5 no GT e os avaliadores 2 e 3 no GC apresentaram concordância de 0,818 (Kappa = 0,557) e 0,875 (Kappa = 0,771) respectivamente (Tabela 6 e Anexo L).

Tabela 6: Distribuição da impressão (opinião) de cada avaliador para as pacientes dos grupos tronco e controle

		piorou		nada mudou		melhorou	
tronco							
	avaliador 1	1	9,1%	4	36,4%	6	54,5%
	avaliador 2	-	-	4	36,4%	7	63,6%
	avaliador 3	3	27,3%	1	9,1%	7	63,6%
	avaliador 4	-	-	2	18,2%	9	81,8%
	avaliador 5	2	18,2%	-	-	9	81,8%
controle							
	avaliador 1	2	25,0%	3	37,5%	3	37,5%
	avaliador 2	1	12,5%	4	50,0%	3	37,5%
	avaliador 3	-	-	5	62,5%	3	37,5%
	avaliador 4	-	-	-	-	8	100,0%
	avaliador 5	1	12,5%	2	25,0%	5	62,5%
Total							
	avaliador 1	3	15,8%	7	36,8%	9	47,4%
	avaliador 2	1	5,3%	8	42,1%	10	52,6%
	avaliador 3	3	15,8%	6	31,6%	10	52,6%
	avaliador 4	-	-	2	10,5%	17	89,5%
	avaliador 5	3	15,8%	2	10,5%	14	73,7%

Após a fase inicial de investigação da concordância entre os pares de avaliadores, foi realizada a determinação do coeficiente de concordância entre todos os avaliadores: Kappa generalizado. Foi observado que todos os avaliadores concordaram quanto à opinião para 3 pacientes do GT e 2 pacientes do GC. Os resultados inferenciais revelaram que, separadamente nos grupos tronco e controle, os avaliadores não concordaram de maneira significativa, uma vez que, os intervalos de confiança para o Kappa para cada grupo contem o valor zero. Na avaliação global das pacientes, agrupando-se os grupos tronco e controle, há concordância entre os avaliadores, porém não expressiva (Tabela 7).

Tabela 7: Estimativas pontuais e intervalares do coeficiente de concordância Kappa generalizado para as pacientes dos grupos tronco e controle

	concordância observada	Kappa	IC*(Kappa)
tronco (n=11)	3/11=0,273	0,112	-0,032 ; 0,255
controle (n=8)	2/8=0,250	0,115	-0,060 ; 0,290
Total (n=19)	5/19=0,263	0,131	0,020 ; 0,242

*intervalo com 95% de confiança para o Kappa

As notas fornecidas pelos cinco avaliadores para cada paciente dos dois grupos, foram somadas e o **GT** obteve média de 2,9, variando de -1 a 5, com desvio-padrão de 2,4. No **GC**, a nota média foi de 2,3, variando de 0 a 5, com desvio-padrão de 1,9. Os resultados inferenciais revelaram que a nota geral do **GT** foi estatisticamente igual a do **GC** ($p=0,600$) (Tabela 10).

Tabela 8: Medidas-resumo da nota geral dada pelos avaliadores às pacientes dos grupos tronco e controle

	n	média	mediana	mínimo	máximo	desvio-padrão
tronco	11	2,9	4,0	-1	5	2,4
controle	8	2,3	1,5	0	5	1,9
tronco+controle	19	32,6	3,0	-1	5	2,2

Não houve casos de infecção e de necrose cutânea nas áreas enxertadas e também não houve complicações nas áreas doadoras do tecido adiposo. As figuras 13, 14, 15 e 16 ilustram 4 pacientes, de ambos os grupos, com diferentes métodos de reconstrução e que apresentaram resultados favoráveis.

Figura 13: A e B: pré-operatório nas posições de frente e oblíqua esquerda de paciente 9 do GT, submetida à reconstrução com retalho TRAM e mastopexia esquerda, em que foram enxertados 111 ml; C e D: pós-operatório de 19 meses em que houve persistência volumétrica de 99% e melhora do contorno em todos os quadrantes

Figura 14: A e B: pré-operatório nas posições de frente e oblíqua esquerda de paciente 7 do GT submetida à reconstrução com latíssimo do dorso e implante e mamoplastia redutora direita, em que foram enxertados 141 ml; C e D: posições de frente e oblíqua esquerda em pós-operatório de 13 meses em que houve persistência volumétrica de 69,1%, observando-se melhora do contorno nos quadrantes inferiores e mediais

Figura 15: A e B: pré-operatório nas posições de frente e oblíqua esquerda de paciente 7 do GC submetida à reconstrução com expansor – implante de silicone da mama direita e mamoplastia redutora esquerda, em que foram enxertados 138 ml de gordura; C e D: pós-operatório de 7 meses em que houve persistência volumétrica de 33,5% e melhora do contorno em todos os quadrantes

Figura 16: A e B: pré-operatório nas posições de frente e oblíqua esquerda de paciente 4 do GC submetida à reconstrução com latíssimo do dorso e implante e mastopexia esquerda, em que foram enxertados 111 ml de gordura; C e D: pós-operatório de 12 meses em que houve persistência volumétrica de 68,6% e excelente resultado na camuflagem da cor azulada presente nos quadrantes superiores e também da transição implante-tórax

6 Discussão

Os enxertos de gordura autólogos vêm sendo muito estudados devido seu grande potencial e versatilidade de uso na prática clínica quer como um preenchedor de partes moles ou como um potente estimulador da cicatrização tecidual⁽¹²⁹⁾. Como peça fundamental nestes processos estão as células-tronco residentes na FVE do tecido adiposo^(73,130). Como a demanda por reconstruções mamárias vêm aumentando e, conseqüentemente, a utilização de enxertos de gordura nos procedimentos secundários, essa área da cirurgia plástica constitui-se em campo fértil para a realização de estudos clínicos envolvendo os enxertos de gordura enriquecidos. Não apenas analisando os efeitos do enriquecimento sobre a persistência volumétrica, mas também sobre a segurança oncológica⁽¹²¹⁾.

Desta forma, no início do desenho deste estudo, o cálculo amostral determinou a distribuição de 9 pacientes por grupo, entretanto o GT terminou com 11 pacientes e o GC com 8 pacientes. As pacientes 1 e 6 do GT (Anexo G) apresentaram persistências volumétricas discrepantes do restante do grupo e, assim, optamos por acrescentar mais 2 pacientes a este grupo. Já no GC, uma paciente retirou seu consentimento informado, manifestando claro desejo de interromper a sua participação no estudo. Em virtude de não haver mais tempo suficiente para que uma nova paciente fosse captada para o GC, este acabou por ter apenas 8 pacientes. Ainda que o número de 9 pacientes por grupo aparente ser

pequeno, as informações relativas às persistências volumétricas que foram fornecidas ao programa de computador STATISTICA, antes do início do estudo, utilizou dados da literatura, que, ao final deste estudo, acabaram por ser confirmados^(8,91,93,131,132).

A randomização do estudo, em bloco e estratificada, ocorreu devido ao estudo ser realizado em um único serviço de reconstrução mamária pertencente a um hospital municipal, composto por apenas um cirurgião plástico e, conseqüentemente, possuir um baixo número de cirurgias anuais. Desta maneira, tal serviço não possuía um grande número de pacientes com reconstruções mamárias apresentando irregularidades de contorno que necessitassem de uma abordagem secundária. Aliado a este fato, observamos uma alta incidência de radioterapia⁽¹³³⁾ entre as pacientes do serviço e que participariam de ambos os grupos. Assim, baseado em dados apresentados por outros estudos^(9,134,135), a radioterapia foi considerada um fator confundidor, que poderia alterar a integração dos enxertos de gordura, e aliada ao fato de o cálculo amostral ter definido um número pequeno de sujeitos de pesquisa por grupo, foi necessário distribuir a radioterapia igualmente entre os grupos. A randomização em bloco e estratificada garante que um preditor (radioterapia) importante do desfecho (persistência volumétrica), seja distribuído mais uniformemente entre os grupos de estudo do que o mero acaso poderia determinar e conseqüentemente pode aumentar o poder de um ensaio clínico de pequeno porte, pois reduz a variação do desfecho causada por desproporções ao acaso de variáveis basais importantes⁽¹²³⁾.

O primeiro grupo a ser constituído foi o GT por razões de prazo da agência financiadora de projetos do Laboratório de Genética do Instituto de Biociências da

USP e tão logo o GT ter sido concluído, o GC foi iniciado. Esta abordagem não tira a ação do acaso sobre a alocação das pacientes, o que pode ser observado pela análise da composição de ambos os grupos (Anexo G e Gráfico 4).

A ausência do sorteio de pacientes para cada grupo não permite nomear este estudo como um “Estudo Clínico Randomizado - RCT (Randomized Clinical Trial)”, entretanto existem ferramentas, como a proposta por Black e Downs, que analisam a força de estudos clínicos não-randomizados⁽¹³⁶⁾. Esta ferramenta avalia o desenho do estudo, a validade externa, a validade interna (vieses e fatores de confusão) e o poder do estudo. A aplicação desta ferramenta ao presente estudo permitiu concluir que a pergunta principal está clara, assim como os principais desfechos, características dos pacientes que compõem as amostras e os fatores de inclusão e exclusão. O estudo incluiu e, conseqüentemente, propiciou a análise de efeitos adversos; os quais são demasiadamente importantes, uma vez que se trata de tática cirúrgica inédita. Em relação à validade externa, o estudo incluiu, em ambos os grupos, pacientes comuns a quaisquer serviços de reconstrução mamária. A única ressalva se faz ao processo de enriquecimento dos enxertos de gordura com as células da FVE, o que só é permitido em ensaios clínicos e ainda sim em serviços que dispõem de laboratórios especializados em terapia celular. Isto constitui um fator limitante para que outros serviços reproduzam esta tática cirúrgica.

A análise dos vieses mostrou que os indivíduos foram cegados quanto ao tipo de enxerto a que seriam submetidos, não foi realizada, em momento algum, qualquer análise retrospectiva, os testes estatísticos aplicados se mostraram adequados, assim como as análises volumétricas das mamas reconstruídas. Outro aspecto, muito importante, foi o tempo decorrido entre a intervenção

(enxerto de gordura) e o principal desfecho (persistência volumétrica), que se mostrou semelhante entre os dois grupos.

O cegamento de algumas etapas do estudo não foi possível por questões estruturais e de pessoal. Não foi possível cegar o cirurgião quanto ao tipo de gordura que estava enxertando por motivos estruturais, entretanto por razões éticas também não lhe era permitido que atuasse de maneira diferenciada prejudicando suas pacientes, de modo a favorecer intencionalmente esta ou aquela tática de enxerto de gordura nos diferentes grupos. Quanto ao cegamento completo da análise das amostras de gordura, isto foi parcialmente possível, pois a bióloga que participou ativamente durante as cirurgias do GT foi quem realizou o processamento das amostras. Entretanto, o processo de contagem celular é automatizado e as imunofenotipagens foram realizadas por um outro biólogo, cegado em razão da disponibilidade dos citômetros de fluxo no Instituto de Biociências da USP. Ainda, os dados obtidos das análises celulares foram apresentados ao pesquisador principal somente ao final das análises volumétricas de ambos os grupos terem sido concluídas. Todos estes fatores juntos conferem poder a este estudo.

Das 19 pacientes participantes, apenas uma paciente de cada grupo recebeu o enxerto de gordura antes de completar 3 anos da cirurgia oncológica, entretanto não apresentavam quaisquer sinais de atividade do câncer de mama. Não há consenso na literatura, de maneira precisa, sobre qual seria o tempo ideal decorrido entre a cirurgia oncológica e o enxerto de gordura. Segundo Petit et al.⁽¹¹³⁾ há maior chance de recidiva loco-regional nos primeiros 24 meses em pacientes operadas por neoplasias intra-epiteliais. Para Ihrai et al. este tempo deve ser maior que 3

anos tendo em conta o tamanho e o grau tumorais, presença ou ausência de receptores hormonais, o envolvimento linfo-vascular, a quantidade de linfonodos positivos na axila, a idade da paciente, assim como seu histórico familiar para o câncer de mama⁽¹³⁷⁾. Gale et al., em recente revisão da literatura sobre a segurança oncológica de mais de 1500 enxertos de gordura após cirurgias mamárias por câncer, mostraram que as taxas de recidiva são as mesmas que as dos grupos controles que não receberam enxertos⁽¹³⁸⁾. Assim, segundo Zimmerlin et al. fica claro que o enxerto de gordura deve ser realizado apenas quando não houver sinais de atividade do câncer de mama⁽¹³⁹⁾.

Nosso estudo possui 2 pacientes pertencentes ao GC com diagnóstico de neoplasia intra-epitelial à época da mastectomia. O tempo decorrido entre a mastectomia e o enxerto de gordura, em uma paciente foi de 16 anos e em outra 2 anos e 8 meses. Esta segunda paciente, com menor tempo entre a mastectomia e o enxerto de gordura, à época tinha 49 anos, tumor de baixo grau e expressão de ki67 de 4%. Levando em conta os fatores de risco propostos por Petit et al.⁽¹¹³⁾, ainda que não sejam um consenso na literatura, esta paciente, especificamente, não pode ser considerada de alto risco para recidiva loco-regional associada ao enxerto de gordura. As pacientes de ambos os grupos, sem exceção, estão e permanecerão em seguimento clínico de longo prazo.

Ainda que as recidivas loco-regionais não tenham sido consideradas um desfecho em nosso estudo, é importante salientar que apesar de não ser um tempo de seguimento longo, não foram observadas no GT recidivas loco-regionais no tempo de seguimento médio de 3 anos. O mesmo aconteceu no GC, que possui tempo de seguimento médio de 16 meses. Este é um dado novo na literatura, que

reforça a segurança oncológica dos enxertos de gordura enriquecidos com células-tronco mesenquimais e contrapõe uma preocupação dos pesquisadores quanto ao potencial destas células de interagir com os diversos tipos de células tumorais, mais especificamente com as células do câncer de mama^(103,121).

Sabidamente, as células-tronco podem interagir com as células tumorais ativas (CD90+) do câncer de mama e favorecer seu crescimento, mas não apresentam quaisquer efeitos sobre as células dormentes do câncer de mama⁽¹³⁹⁾. Mais do que isso, estudo conduzido por Kucerova et al. demonstrou que as CTDG interagem com células de câncer de mama da linhagem SK-BR-3 induzindo tanto alterações morfológicas nestas células como a transição epitélio-mesênquima. As CTDG induziram também um aumento da aderência celular e a formação de mamóferas. Por outro lado, diminuíram a proliferação das células tumorais e aumentaram sua sensibilidade a quimioterápicos como a doxorrubicina e o 5-fluoracil. Esse conjunto de ações caracteriza uma sinalização bidirecional, ficando claro que as células estromais derivadas do tecido adiposo interagem de maneira complexa com as células tumorais podendo alterar suas propriedades e criar uma interação dinâmica relevante ao comportamento tumoral e suas respostas⁽¹⁴⁰⁾.

É consenso na literatura que os enxertos de gordura tendem a manter seu volume após 6 meses da sua realização^(34,93,141). Desta forma, todas as ressonâncias magnéticas deste estudo foram realizadas com um prazo mínimo de 6 meses após a realização do enxerto de gordura, em ambos os grupos. Diferentes métodos foram desenvolvidos e aplicados, ao longo da história, para se determinar o volume mamário, tais como fórmulas antropométricas, moldes termoplásticos, método de deslocamento de água (princípio de Arquimedes), exames de ressonância

magnética das mamas e, mais recentemente, as imagens tridimensionais^(89,142-144). A RNM é tida como o padrão-ouro na determinação do volume da mama, apresentando desvio médio, no cálculo, de aproximadamente 1,1% - o menor entre os diversos métodos – podendo realizar também uma análise qualitativa de mamas normais e reconstruídas⁽¹²⁵⁾.

A metodologia desenvolvida por Herold et al. para determinar o volume mamário, tem como parâmetros anatômicos a fáscia do músculo peitoral maior, a linha médio-esternal e a artéria torácica lateral, fundamentais na confecção das áreas de interesse nos cortes axiais da RNM de mamas normais⁽¹²⁵⁾. O limite superior da mama não possui correspondente anatômico identificável nos cortes sagital e axial da RNM. Desta forma, se os limites de uma mama sadia já não são muito evidentes, os das mamas reconstruídas são mais imprecisos ainda em virtude das alterações anatômicas decorrentes dos procedimentos cirúrgicos oncológico e reconstrutivo. Assim, a demarcação externa de todo o contorno da mama reconstruída com as cápsulas de vitamina E permitiu aumentar a precisão na delimitação dos limites inferior, superior, medial e lateral e consequentemente realizar os cálculos volumétricos de maneira mais fidedigna.

Assim, o elaborado método desenvolvido neste estudo prospectivo e controlado com o objetivo de promover, em tempo real, na sala de cirurgia, um enriquecimento dos enxertos de gordura com um maior número de células da FVE (proporção 2:1) do que os já publicados na literatura^(10,17,60,145,146) onde a volumetria teve, também, importante papel; não propiciou, no **GT**, maior persistência volumétrica quando comparado ao **GC**.

Duas pacientes do GT apresentaram volumetrias discrepantes. A primeira paciente foi irradiada e apresentava reconstrução com retalho do músculo latíssimo do dorso com implante de silicone e recebeu o menor volume de enxerto de gordura dentre todas as pacientes dos dois grupos e, ainda, apresentou esteatonecrose no pós-operatório. Considerando o volume do enxerto, a radioterapia e o erro interno do método de cálculo volumétrico esta paciente acabou por apresentar uma volumetria negativa. A segunda paciente, reconstruída com um TRAM, apresentou aumento significativo do peso corporal no momento da RNM de controle e seu cálculo volumétrico ficou acima dos 100% (Anexo G). Os enxertos de gordura podem ter seu volume alterado de acordo com flutuações do peso corporal⁽¹⁰²⁾ e somado ao fato de o tecido adiposo presente no TRAM ser um leito receptor de boa qualidade e apresentar uma relação de capacidade enxerto-leito receptor muito favorável⁽¹³²⁾, o volume final da mama estudada acabou por extrapolar os 100%.

A análise qualitativa dos enxertos de gordura, neste estudo, envolveu contagem celular e imunofenotipagem e acabou por confirmar dados publicados previamente por outros autores que também demonstraram existir uma grande variabilidade no número de células presentes na FVE fresca nos diferentes indivíduos^(70,80,84,147). Em média, 1 grama de tecido adiposo fornece de $1,5 - 5 \times 10^5$ células isoladas a partir da FVE fresca, isto é, sem qualquer expansão por cultivo celular. Neste estudo, a celularidade basal média tanto no GT como no GC está em acordo com os valores médios encontrados na literatura e o método de enriquecimento desenvolvido neste estudo para o **GT** e, chamado de **2:1**, promoveu um enriquecimento significativo quando comparado ao número basal de células.

Este é um dado novo na literatura, uma vez que nenhum estudo publicado até o momento utilizou uma taxa de enriquecimento, em tempo real, superior à desenvolvida por Yoshimura et al.⁽⁶⁰⁾. Somente foi possível obter-se esta taxa de enriquecimento em virtude de contarmos com uma bióloga experiente trabalhando conjuntamente com uma equipe cirúrgica treinada, aliadas à disponibilidade de uma grande quantidade de materiais e equipamentos na sala de cirurgia.

Não existe consenso de que idade, sexo e índice de massa corporal tenham algum impacto sobre o rendimento celular, entretanto, de maneira consensual, as regiões infra-umbilical do abdome, internas das coxas e joelhos apresentam maiores rendimentos no número de células presentes na FVE quando comparadas aos flancos, porção supra-umbilical do abdome e região trocanteriana^(73,80) e estes dados embasaram o nosso estudo.

Os resultados de imunofenotipagens encontrados na literatura divergem muito devido ao momento em que este teste é realizado. Poucos autores realizaram a identificação do imunofenótipo celular na FVE fresca, sendo que a maioria o realizou após 3, 7 e 10 dias de cultivo quando ocorre a confluência celular^(75,147). Os nossos resultados de imunofenotipagem demonstraram que as expressões dos marcadores celulares variaram muito entre as pacientes de ambos os grupos, entretanto foram semelhantes aos resultados obtidos por Yoshimura et al.^(76,84).

Um dado novo encontrado em nosso estudo foi a identificação da correlação entre a persistência volumétrica e a expressão do marcador CD90, considerado um típico marcador mesenquimal⁽⁷⁵⁾. Desta forma, analisando as imunofenotipagens de todas as pacientes de ambos os grupos, foi possível identificar através da análise do coeficiente de Pearson, que as maiores persistências volumétricas estavam

acompanhadas por uma maior expressão de CD90. Outra informação proveniente da análise dos imunofenótipos é que as pacientes do GT expressaram mais CD90 que as do GC, o que resultou em uma maior persistência volumétrica no GT, ainda que sem significância estatística na análise comparativa. Isto sinaliza que uma taxa de enriquecimento maior que a 2:1 poderá alcançar diferença estatisticamente significativa, considerando que estudos prévios realizados em humanos, que demonstraram maiores persistências volumétricas com diferença estatisticamente significativa, ou empregaram a técnica CAL⁽⁶⁷⁾ ou realizaram enriquecimentos suprafisiológicos⁽⁸⁶⁾ com células expandidas em cultura. Entretanto, faz-se necessário mencionar que, em ambos os estudos, os leitos receptores eram livres de radioterapia e fibrose.

A análise das respostas da ferramenta “Questionário de Satisfação” mostrou que a reconstrução mamária é fundamental para o processo de recuperação da imagem corporal e da autoestima⁽¹⁴⁸⁾ e esta informação ficou evidente quando, considerando os dois grupos, 100% das pacientes escolheriam realizar a reconstrução mamária e confirmaram que receberam informações suficientes sobre as variantes dos enxertos de gordura do presente estudo, assim como 90% escolheriam, se necessário, realizar o enxerto de gordura para melhorar o resultado da reconstrução mamária.

As pacientes do GC apresentaram maior tendência de estar satisfeitas que as pacientes do GT e a explicação para este evento é a ocorrência de esteatonecrose no GT. Achado semelhante foi encontrado por Dutra et al., onde pacientes que tiveram complicações com a reconstrução imediata de suas mamas apresentaram menores taxas de satisfação⁽²⁴⁾. A ocorrência de esteatonecrose

notadamente causou angústia nas pacientes, devido à possibilidade de se tratar de recidiva tumoral e que, inexoravelmente, levou à realização de biópsias em 3 de 4 pacientes com este diagnóstico. Os exames anatomopatológicos destas 3 pacientes confirmaram a suspeita clínica e mostraram se tratar de esteatonecrose. A apresentação clínica das esteatonecroses é muito característica e familiar ao cirurgião plástico que realiza e convive com os enxertos de gordura em reconstrução mamária, entretanto este evento aos olhos do mastologista e do oncologista, que acompanham estas pacientes, é visto como uma possível recidiva tumoral. Doren et al. propuseram um algoritmo para a avaliação e conduta de nodulações que surgem após a enxertia de gordura em mamas⁽¹⁶⁾. Se por um lado a aplicação deste algoritmo poderia ter evitado estas biópsias, por outro permitiu que uma paciente permanecesse em acompanhamento ambulatorial com exame clínico de rotina sem a necessidade de punção ou biópsia.

O GT deste estudo teve uma alta incidência de esteatonecrose, a maior entre as principais séries já publicadas^(8,15,98-100,112,149-151), mas é importante lembrar que, curiosamente, apenas as pacientes do GT submetidas à radioterapia apresentaram necrose gordurosa. Por outro lado, o GC não apresentou tal evento, o que também não é comum, considerando que todas as publicações sobre enxertos de gordura em reconstrução mamária apresentaram esta complicação mesmo quando o volume médio enxertado foi baixo. Entretanto, a ocorrência nula de necrose gordurosa no GC faz a ocorrência do GT se tornar mais evidente.

A possível explicação para esta alta ocorrência de necrose gordurosa envolve, em parte, a biologia dos enxertos de gordura em um “leito receptor favorável”. Após a obtenção e processamento do tecido adiposo, até que se realize a enxertia

propriamente dita, os adipócitos são submetidos ao trauma cirúrgico e à hipóxia. Após a enxertia, até que ocorra a revascularização do tecido enxertado – o que se dá entre o 3º e o 4º dias⁽¹⁵²⁾ – as células recebem oxigênio e nutrientes através da embebição plasmática. Os adipócitos são pouco resistentes a este processo e muitos adipócitos maduros necrosam. Entretanto, já foi comprovado que as CTDG são mais resilientes que os adipócitos e podem sobreviver tanto ao trauma cirúrgico quanto ao período de hipóxia que ocorre até o início da revascularização⁽¹⁵³⁾. Em média, as CTDG podem suportar concentrações de oxigênio da ordem de 1% por até 72 horas⁽¹⁵³⁾. Desta forma, quando levamos em conta um leito receptor que apresenta fibrose decorrente das manipulações cirúrgicas, somado aos efeitos da radioterapia, entendemos que mesmo as CTDG não puderam sobreviver, em parte, neste leito receptor hostil e necrosaram também.

Outra possibilidade que pode se somar à teoria do “leito receptor hostil”, com muita fibrose, é a possibilidade de sinalização pela matriz extracelular do leito receptor para que ocorra uma diferenciação das CTDG em miofibroblastos. Evento semelhante a este foi observado por Yoshimura et al. em enxertos de gordura do tipo CAL para aumento primário de mamas. Naquele estudo, os autores injetaram as CTDG suspensas em solução salina, separadamente dos adipócitos, no tecido celular subcutâneo e acabaram por obter focos pequenos e isolados de fibrose e que denominaram de “fibrogênese ectópica”⁽¹⁵⁴⁾. Assim, supomos que, nas áreas de esteatonecrose, além de ocorrer necrose de adipócitos e das CTDG, pôde ter ocorrido uma sinalização da matriz extracelular do leito receptor para que algumas CTDG periféricas à necrose gordurosa pudessem se diferenciar em miofibroblastos e secretar colágeno e formar os pequenos focos de necrose

gordurosa observados. Ainda que a incidência de necrose gordurosa tenha sido maior no GT, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos. À luz destes resultados, especulamos que pacientes submetidas à radioterapia como parte integrante do tratamento oncológico e, portanto, previamente à enxertia de gordura; podem não ser candidatas a receber enxertos de gordura enriquecidos com as células presentes na FVE, ao menos, nesta proporção.

O impacto da radioterapia sobre o leito receptor e consequentemente sobre a integração dos enxertos de gordura é controversa^(16,99), ainda que exista um número maior de artigos que mostram que as pacientes submetidas à radioterapia necessitaram de um número maior de enxertos de gordura, assim como um maior volume para se obter o resultado desejado^(15,134,135). Rigotti et al. mostraram os efeitos danosos da radioterapia sobre os tecidos do tórax em pacientes mastectomizadas e, posteriormente, os efeitos benéficos cicatriciais que o tecido adiposo enxertado promoveu, basicamente melhorando a microcirculação local⁽⁹⁾. Tais efeitos são mediados tanto pela diferenciação das CTDG em células endoteliais⁽¹⁵⁵⁾ como pela secreção de fatores pró-angiogênicos⁽¹⁵⁶⁾ e anti-apoptóticos⁽¹⁵⁷⁾. Longo et al. e Khouri et al. demonstraram, em diferentes estudos, que pacientes submetidas à radioterapia necessitaram de um maior número de enxertos que as pacientes controles para se alcançar o efeito desejado^(134,135). Outros autores publicaram achados sobre os efeitos benéficos promovidos pelos enxertos de gordura em tecidos irradiados⁽⁵⁷⁾, sobre a remodelagem cicatricial⁽⁵⁵⁾, a cicatrização de úlceras em membros inferiores⁽¹³⁰⁾, fístulas reto-vaginais e fístulas perianais⁽⁶⁴⁻⁶⁶⁾.

Neste estudo, em virtude do pequeno número de participantes em ambos os grupos, não foi possível realizar cálculos estatísticos (dentro dos grupos e entre os grupos) para analisar o impacto da radioterapia sobre a persistência volumétrica e, mais, este estudo avaliou, de maneira comparativa, a persistência volumétrica após uma única sessão de enxerto de gordura.

Os resultados provenientes das avaliações por cirurgiões plásticos mostraram que, apesar de não concordarem entre si com os resultados proporcionados pelos enxertos de gordura, as notas finais atribuídas por eles foram iguais nos dois grupos. Isto reflete o benefício e a importância dos enxertos de gordura na reconstrução mamária secundária e, ao mesmo tempo, mostra que diferentes experiências e vivências com a reconstrução mamária produziram análises díspares. Como as avaliações foram realizadas de maneira cegada não foi possível estabelecer qualquer correlação entre experiência com reconstrução mamária e a nota de cada avaliador.

No nosso entender, as perspectivas futuras para os enxertos de gordura envolvem uma combinação de condicionamento do leito receptor^(14,93,134) de modo a melhorar as condições fisiológicas locais dos leitos considerados "hostis" e "não-hostis", ampliando a capacidade da relação enxerto-leito receptor^(130,132). Nos enxertos de gordura, a suplementação com as células da FVE será, pelo menos por enquanto, uma tática necessária considerando que a participação dos precursores adipocitários e endoteliais é muito importante na manutenção do volume final do enxerto, tanto por participação direta das células^(51,73,153) como pela ação parácrina^(73,157) que exercem no microambiente existente na interface das células do enxerto com as células do leito receptor.

7 Conclusões

Pode-se concluir a partir dos dados produzidos por este estudo que a realização de enriquecimento dos enxertos de gordura, na proporção 2:1, em tempo real, na sala de cirurgia, não produziu maior persistência volumétrica quando comparado aos enxertos não enriquecidos.

A realização da imunofenotipagem demonstrou haver uma correlação positiva entre a expressão do marcador CD90, pelas células da FVE, e a persistência volumétrica, tornando-o um preditor deste desfecho.

A principal complicação dos enxertos de gordura deste estudo foi a esteatonecrose, cuja incidência foi igual nos dois grupos.

8 Anexos

Anexo A – Tabela de autores que publicaram sobre enxertos de gordura após o advento da lipoaspiração

Anexo A - trabalhos pioneiros nacionais e internacionais após o advento da lipoaspiração.

AUTOR	ANO	OBTENÇÃO	PREPARO	ENXERTIA	SOBRECORREÇÃO	ÁREAS	ABSORÇÃO	N	SEGUIMENTO
Illouz	1986	aspirador cânula de 6 a 10 mm	nenhum	NI	NI	face e corpo	NI	37	16 meses
Chajchir e col.	1986	aspirador cânula de 5 mm	nenhum	seringa microcânula 1 mm	50%	face	30% a 60%	36	12 meses
Matsudo e col.	1988	aspirador cânulas de 4 a 6 mm	nenhum	seringa cânulas diversas	35%	face, membros e corpo	20% a 50%	208	18 meses
Chajchir e col.	1989	aspirador cânulas de 6 a 9 mm	nenhum	seringa-pistola cânulas 1,5 e 2 mm	30% a 50%	face, membros e corpo	NI	253	NI
Horl e cols.	1991	aspirador cânulas de 6 e 8 mm	lava a gordura com solução de Ringer	seringa de 2cc cânula	não faz	face	55%	53	12 meses
Pereira e col.	1996	seringas de 60cc cânulas de 3 e 5 mm	lavagem e decantação	seringas de 60 cc cânulas de 3mm	NI	glúteos e membros inferiores	20%	140	6 meses ao menos
Coleman	1997	seringas de 10 cc cânula de 3 mm	centrifugação 1200 g/3 minutos	microcânula 1,2 mm	não faz	face	NI	7	NI
Lambros	1998	seringas de 10 cc cânulas de 2,3 e 3 mm	centrifugação 1200 g/2 minutos	microcânula 1,4 mm	não faz	face	NI	NI	NI
de Benito e cols.	1999	seringa cânulas de 4 e 5 mm	centrifugação 1200 g/5 min	cânula 4 mm	20% a 30%	cicatrices deprimidas no abdome	NI	30	36 meses

NI = não informado

Anexo B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : .M ☐ F ☐
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO Nº APTO:
BAIRRO: CIDADE
CEP:..... TELEFONE: DDD (.....)
2. RESPONSÁVEL LEGAL
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)
DOCUMENTO DE IDENTIDADE :.....SEXO: M ☐ F ☐
DATA NASCIMENTO.:/...../.....
ENDEREÇO: Nº APTO:
BAIRRO: CIDADE:
CEP: TELEFONE: DDD (.....).....

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: O IMPACTO DA IMUNOFENOTIPAGEM DAS CELULAS-TRONCO MESENQUIMAIS PRESENTES NA FRAÇÃO VASCULO-ESTROMAL DO TECIDO ADIPOSE NA LIPOENXERTIA AUTÓLOGA EM PACIENTES SUBMETIDAS A REFINAMENTOS DE RECONSTRUÇÃO MAMARIA.
2. PESQUISADOR : LUIZ ALEXANDRE LORICO TISSIANI
CARGO/FUNÇÃO: MEDICO CIR PLASTICO-INSCRIÇÃO CREMESP Nº 80775/SP
UNIDADE DO HCFMUSP:
3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:
RISCO MÍNIMO ☐	RISCO MÉDIO ☐
RISCO BAIXO ☐	RISCO MAIOR ☐
4. DURAÇÃO DA PESQUISA : 10 MESES

1 – essas informações estão sendo fornecidas para sua participação voluntária neste estudo, que visa analisar as células-tronco mesenquimais adicionadas ao enxerto de gordura que será realizado em sua cirurgia e analisar o tamanho final da mama que foi corrigida com este enxerto;

2 – será removida gordura do seu abdome, flanco ou culote e parte da gordura será utilizada para se obter as células-tronco. As células-tronco serão adicionadas ao enxerto de gordura antes deste ser colocado na sua mama. Uma amostra desta gordura misturada com as células-tronco será enviada ao laboratório para estudo;

3 – uma vez no laboratório, as células serão contadas e alguns testes serão realizados;

4 – os desconfortos desta cirurgia são os mesmos de uma lipoaspiração (dor, rouidão e possível formigamento) e são transitórios;

5 – o possível benefício desta cirurgia é uma melhorar a pega do enxerto de gordura e consequente melhor resultado estético;

6 – em casos selecionados o enxerto de gordura poderá ser substituído por uma prótese de silicone e isto será discutido com você antes de sua decisão;

7 – em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é o Dr. Luiz Alexandre Lorico Tissiani que pode ser encontrado no endereço Av. Celso Garcia 4815, 1o andar (Ambulatório de Reconstrução Mamária) e no telefone 11-21146040. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) –Av. Dr. Arnaldo, 455 – Instituto Oscar Freire – 1º andar– tel: 3061-8004, FAX: 3061-8004– E-mail: cep.fmusp@hcnet.usp.br

8 – lhe é garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição;

09 – as informações obtidas serão analisadas em conjunto com as de outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente;

10 – você tem o direito de ser mantida atualizada sobre os resultados parciais da pesquisa a qualquer momento;

11 – não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

12 - os dados obtidos serão utilizados única e exclusivamente nesta pesquisa e serão divulgados em publicação para conhecimento da comunidade científica;

Acredito ter sido suficientemente informada a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo " O IMPACTO DA IMUNOFENOTIPAGEM DAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS PRESENTES NA FRAÇÃO VÁSCULO-ESTROMAL DO TECIDO ADIPOSEO NA LIPOENXERTIA AUTÓLOGA EM PACIENTES SUBMETIDAS A REFINAMENTOS DE RECONSTRUÇÃO MAMARIA".

Eu discuti com o Dr. Luiz Alexandre Lorico Tissiani sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de

Anexo C – Ficha de coleta de dados

FICHA DE COLETA DE DADOS					
NOME:					
RG:		CPF:		IDADE:	DN:
ENDEREÇO:				BAIRRO:	CEP:
CIDADE:		ESTADO:			
TELEFONES:	CEL:	RES.:	COM.:	RECADO:	
EMAIL:			PROFISSÃO:		NOME:
REG. HOSP.:		TERMO DE CONSENTIMENTO: ()SIM ()NÃO			
TIPO DE RECONSTRUÇÃO: ()TRAM ()DORSAL + IMPLANTE ()EXPANSOR + IMPLANTE ()IMPLANTE DIRETO ()REC. SECUNDÁRIA ()OUTRO:					
ANT.FAMILIAR DE CA DE MAMA:					
RNM PRÉ-OP.		DATA:	LOCAL:	VOLUME CALCULADO:	
PROGRAMA E-STHETIX - PRÉ-OP.:			VOLUME CALCULADO:		
PESO:	ESTATURA:	IMC:	DIST. INTERPAPILAR:	PER.TORAX:	
CIRURGIA:		DATA:	LOCAL:	VOLUME ENXERTADO:	
QUADRANTES ENXERTADOS:					
No CÉLS PELLET:			No CÉLS PRE-PLATING:		
MARCADORES: ()CD105 ()CD90 ()CD73 ()CD31 ()CD34 ()DLK1					
PERCENTIS: %CD105 %CD90 %CD73 %CD31 %CD34 %DLK1					
EVOLUÇÃO: ()SATISFATÓRIA, SEM EVENTOS ()COMPLICADA:					
()OUTROS:			()PERDA DE SEGUIMENTO		
RNM PÓS-OP.		DATA:	LOCAL:	VOLUME CALCULADO:	
PROGRAMA E-STHETIX PÓS-OP.:			VOLUME CALCULADO:		
GRAU DE SATISFAÇÃO DA PACIENTE: ()10 ()9 ()8 ()7 ()6 ()5 ()4 ()3 ()2 ()1					
FOTOS PRÉ: ()SIM ()NÃO			FOTOS PÓS: ()SIM ()NÃO		
NECESSITARÁ DE OUTRO PROCEDIMENTO: ()SIM ()NÃO					
CRESCIMENTO DE PÊLOS: ()NA ÁREA ENXERTADA ()OUTRA LOCALIZAÇÃO					
OBSERVAÇÕES:					

Anexo D - Diagrama

DATA:___/___/___
PACIENTE:_____
TIPO DE RECONSTRUÇÃO:_____
MAMA:_____

Anexo E - “Questionário de Satisfação”

ADAPTAÇÃO DAS PERGUNTAS DE ALDERMAN PARA SATISFAÇÃO DO ENXERTO DE GORDURA EM REFINAMENTOS DE RECONSTRUÇÃO MAMÁRIA

- 1) Com o conhecimento que você tem hoje, você certamente escolheria fazer a reconstrução da sua mama?
()SIM ()NAO
- 2) Com o conhecimento que você tem hoje, você certamente escolheria se submeter ao procedimento de enxerto de gordura para melhorar o resultado de sua reconstrução mamaria?
()SIM ()NAO
- 3) De uma maneira geral, você está satisfeita com o resultado do enxerto de gordura em sua mama reconstruída?
()SIM ()NAO
- 4) Você recomendaria o enxerto de gordura para uma amiga que está buscando melhorar o resultado de sua reconstrução mamária?
()SIM ()NAO
- 5) Você tem o sentimento de que recebeu informações suficientes a respeito do enxerto de gordura que lhe permitiu tomar a decisão de fazer a cirurgia de refinamento de sua reconstrução mamária?
()SIM ()NAO
- 6) Considerando o enxerto de gordura e o atual resultado, que nota você daria para a sua reconstrução mamária (faça um círculo na nota abaixo)?

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
- 7) Considerando o enxerto de gordura, demonstre o grau de satisfação com o resultado atual de sua reconstrução mamária, selecionando uma das figuras abaixo:

Anexo F – Ficha de Avaliação de Resultados por Cirurgiões Plásticos

ANALISADOR, FAÇA UM "X" EM UM DOS QUADROS ABAIXO PARA CADA CASO. CERTIFIQUE-SE DO NÚMERO DO CASO. O OBJETIVO DA AVALIAÇÃO É SABER SE HOVE OU NÃO MELHORIA DO CONTOURNO DA MAMA APÓS O ENXERTO DE DE GORDURA NA "MAMA RECONSTRUÍDA". NÃO AVALIE A SIMETRIA ENTRE AS MAMAS.

NOTAS	PIOROU MUITO	PIOROU POUCO	NADA MUDOU	MELHOROU POUCO	MELHOROU MUITO
CASO 1					
CASO 2					
CASO 3					
CASO 4					
CASO 5					
CASO 6					
CASO 7					
CASO 8					
CASO 9					
CASO 10					
CASO 11					
CASO 12					
CASO 13					
CASO 14					
CASO 15					
CASO 16					
CASO 17					
CASO 18					
CASO 19					

Anexo G – Dados Gerais da Tese

DADOS GERAIS DA TESE														
	NOME	AGE	RADIO	CELS BASAL	CELS 2:1	RELAÇ	VOLUMETRY1	VOL FAT	VOLUMETRY2	PERSISTENCY	F UP MRI	IMC1	IMC2	COMPLICAÇÕES ENXERTO
GRUPO TRONCO														
1	ANA JOAQUINA	55	SIM	2.500.000	6.400.000	2,56	630,45	45	618,15	119,49%	12	24,24	24,03	esteatonecrose puntiforme QSL
2	LUZIA MARIA	47	SIM	X	150.000	X	527,11	92	589,83	95,30%	11	25,4	25,8	esteatonecrose extensa
3	GRAÇA FARIA	49	NAO	110.000	250.000	2,27	623,22	177	735,37	63,40%	15	27,99	27,63	nao
4	EMILIA CAETANO	48	SIM	21.600	42.000	1,94	885,96	137	1005,43	97,99%	15	27,18	27,55	esteatonecrose puntiforme QSL
5	JOANA MENDES	51	NAO	230.000	720.000	3,13	686,93	180	857,93	99,06%	13	28,7	28,7	nao
6	ALDA REGINA	41	SIM	1.300.000	1.800.000	1,38	1048,12	147	1454,6	121,50%	16	27,5	29,08	nao
7	MARIA ERMINDA	54	SIM	96.000	240.000	2,5	702,85	141	800,25	69,07%	13	24	25,11	nao
8	GLAUCE ENICE	44	SIM	90.000	400.000	4,44	547,3	117	584,71	31,97%	16	23,5	23,3	esteatonecrose em QQSS puntif
9	OSVALDINA	56	SIM	230.000	700.000	3,04	732,2	111	842,97	99,96%	19	23,9	23,9	nao
10	LUZIA COTRIM	58	NAO	550.000	1.170.000	2,12	254,14	171	377,69	71,80%	12	25,6	25,6	nao
11	MARILENE BARR	43	SIM	120.000	325.000	2,71	512,32	159	562,22	31,38%	17	30,93	29,66	2 cistos oleosos
				5.247.600	12.197.000			1477			288,94		290,36	
Resultados			72,70%	524.760	1.108.818	2,61	134,3		c/outliers	70,17%	14,3m	26,26	26,39	36,4% esteatonecrose todas c/ RTX
									s/outliers	73,31%				
GRUPO CONTROLE														
1	MARIA FATIMA	51	NAO	147.000			674,58	96	732,6	60,50%	16m	29,15	29,15	nao
2	NICOLINA JESUS	40	NAO	145.000			470,92	75	525,57	72,86%	19m	20,82	20,44	nao
3	SUELI BUENO	56	SIM	4.200.000			383,83	147	447,55	41,63%	19m	32,39	32,62	nao
4	ILDA GUERRA	69	SIM	370.000			785,21	111	861,3	68,60%	13m	25,88	28,14	nao
5	KARINA CARDOS	38	SIM	76.000			603	108	678,85	70,23%	11m	24,13	26,1	nao
6	JOSELIA LOBO	36	SIM	221.000			552,97	115	584,7	27,65%	11m	24,07	23,22	nao
7	ALMIRA PRIMO	59	NAO	1.910.000			778,7	138	824,9	33,50%	7m	25,58	25,19	nao
8	ROSANGELA CAS	49	SIM	76.000			253,25	102	290,2	36,20%	7m	24,85	24,34	nao
				7.145.000			892				206,87		209,2	
Resultados			62,50%	893.125			111,5		51,39%		12,9m	25,85	26,15	0% de esteatonecrose

Anexo H – Pannel da Contagem Celular

Tabela 1: Concentração Celular no Tecido Adiposo - Experimental										
item	registro	nome	data de nascimento	data da cirurgia	contagem celular - vivas			contagem celular - total		
					Controle cell/mL gordura (x 10 ⁵)	Enriquecido 2:1 cell/mL gordura (x 10 ⁵)	Proporção enriquecido/ controle	Controle cell/mL gordura (x 10 ⁵)	Enriquecido 2:1 cell/mL gordura (x 10 ⁵)	Proporção enriquecido/c ontrole
1	F5648-1	Ana Joaquina Silva Costa	20 abril 1956	05-abril-2011	25	64	2,56	120	320	2,67
2	F8179-1	Luzia Maria da Conceição Graça Faria Camara	13 dezembro 1963	7-setembro-201	x	1,5	x	x	1,95	x
3	F8180-1	Marques Emilia Caetano	26 novembro 1962	6-março-2012	1,1	2,5	2,27	2,3	3,8	1,65
4	F8181-1	da Silva Joana Mendes da	4 março 1964	27-março-2012	0,216	0,42	1,94	0,4	0,81	2,03
5	F8182-1	Mota Alda Regina Lopes	4 fevereiro 1961	10-abril-2012	2,3	7,2	3,13	20,3	45,2	2,23
6	F8183-1	Fernandes Maria Erminia	13 janeiro 1971	17-abril-2012	13	18	1,38	x	x	x
7	F8184-1	Nogueira	29 agosto 1957	26-junho-2012	0,96	2,4	2,50	1,82	4,8	2,64
8	F8185-1	Glauce Enice da Silva de Medeiros Oswaldina Ferreira	22 junho 1968	07-agosto-2012	0,9	4	4,44	5,9	31	5,25
9	F8186-1	da Silva	x	14 -Ago-2012	2,3	7	3,04	8,2	24	2,93
10	F8200-1	Luzia de Lima Cotrim Marilene de Barros	10 abril 1954	13 novembro 2013	5,5	11,7	2,13	34,5	42	1,22
11	F8753-1	Teixeira	29 janeiro 1970	03 set 2013	1,2	3,25	2,71	1,7	4	2,35

Tabela 2: Concentração Celular no Tecido Adiposo - Controles						
item	registro	nome	data de nascimento	data da cirurgia	Controle Coleman	Controle Coleman
					cell/mL gordura vivas (x 10 ⁵)	cell/mL gordura celulas totais (x 10 ⁵)
1	F8187-1	Maria de Fatima da Silva dos Santos Nicolina de Jesus Souza de Oliveira	22 julho 1961	03-Out-2012	1,47	x
2		Sueli Bueno da	27 julho 1972	28-mai-2013	1,45	3,65
3	F8588-1	Silva	28 fev 1957	26/jun/13	42	52
4	F8200-1	Luzia de Lima Cotrim Ilda Guerra	10 abril 1954	22/jan/14	0,69	2,5
5	F9179-1	Calamari	22/mar/44	18 fev 2014	3,7	6,5

Anexo I - Tempo de seguimento, em meses, entre a mastectomia e o enxerto e entre o enxerto e a última consulta em ambos os grupos (GT e GC)

	DA MASTECTOMIA AO ENXERTO	DO ENXERTO À ÚLTIMA CONSULTA	TEMPO DECORRIDO TOTAL
GRUPO TRONCO - GT			
1	44	49	93
2	45	45	90
3	38	38	76
4	43	38	81
5	30	37	67
6	58	37	95
7	36	34	70
8	49	33	82
9	48	33	81
10	240	30	270
11	49	20	69
MÉDIA	61,8	35,8	97,6
	5 anos e 2 meses	3 anos	8 anos e 2 meses
GRUPO CONTROLE - GC			
1	38	30	68
2	37	23	60
3	87	21	108
4	198	15	213
5	29	13	42
6	99	12	111
7	68	8	76
8	32	8	40
MÉDIA	73,5	16,3	89,7
	6 anos e 1 mês	1 ano e 4 meses	7 anos e 5 meses

Anexo J – Painei da Imunofenotipagem

PROJETO MAMA - LUIZ ALEXANDRE LORICO TISSIANI

Imunofenotipagem das Células da Fração Vásculo Estromal do Tecido Adiposo (sem cultivo)- Porcentagem de Marca

		Tecido Adiposo						
		marcadores						
registro	nome	CD29	CD31	CD34	CD45	CD73	CD90	CD105
EXPERIMENTAL								
F8179-1	Luzia Maria da Conceição	94,9	0,52	92,3	6,88	88,88	90,06	35,52
F8180-1	Graça Faria Marques	80,54	0	x	0	58,8	71,02	0
F8182-1	Joana Mendes da Mota	91,88	65,92	x	18,12	39,78	93,68	89,78
F8184-1	Maria Erminia Nogueira	94,7	56,6	85,86	1,6	68,72	96,66	52,3
F8185-1	Glauce Enice da S Medeiros	61,26	0,74	18,64	0,62	4,62	61,82	10,22
F8186-1	Oswaldina Ferreira da Silva	21,78	0	11	0,38	0	58,86	19,58
F8200-1	Luzia de Lima Cotrim	45,54	20,11	11,81	32,5	21,7	81	43,28
CONTROLES								
F9265-1	Karina Cardoso Coutinho	61,16	35,72	38,32	0	28,86	58,38	34,6
F9283-1	Joselia Lobo Golçalves	86,6	27,83	0	0	26,54	42,6	0
F9635-1	Almira Vieira Primo	56,48	20,9	52,14	0,6	32,2	5,58	33,16
F9669-1	Rosangela L Cassolato	97,24	48,9	65,3	61,08	27,74	1,38	79,08

Anexo K - Distribuição das respostas das pacientes dos GT e GC ao “Questionário de Satisfação”

	tronco (n=11)		controle (n=8)		Total (n=19)		p
pergunta 1 ¹							
sim	11	100,0%	8	100,0%	19	100,0%	-
não	-	-	-	-	-	-	
pergunta 2 ²							
sim	10	90,9%	7	87,5%	17	89,5%	>0,999 ^c
não	1	9,1%	1	12,5%	2	10,5%	
pergunta 3 ³							
sim	8	72,7%	7	87,5%	15	78,9%	0,603 ^c
não	3	27,3%	1	12,5%	4	21,1%	
pergunta 4 ⁴							
sim	10	90,9%	6	75,0%	16	84,2%	0,546 ^c
não	1	9,1%	2	25,0%	3	15,8%	
pergunta 5 ⁵							
sim	11	100,0%	8	100,0%	19	100,0%	-
não	-	-	-	-	-	-	
pergunta 6 ⁶							
5	1	9,1%	-	-	1	5,3%	0,075 ^b
8	3	27,3%	1	12,5%	4	21,1%	
9	3	27,3%	-	-	3	15,8%	
10	4	36,4%	7	87,5%	11	57,9%	
pergunta 7 ⁷							
muita insatisfeita	-	-	-	-	-	-	0,520 ^c
insatisfeita	-	-	1	12,5%	1	5,3%	
nem insatisfeita, nem satisfeita	2	18,2%	-	-	2	10,5%	
satisfeita	4	36,4%	2	25,0%	6	31,6%	
muito satisfeita	5	45,5%	5	62,5%	10	52,6%	

¹Com o conhecimento que você tem hoje, você certamente escolheria fazer a reconstrução da sua mama?

²Com o conhecimento que você tem hoje, você certamente escolheria se submeter ao procedimento de enxerto de gordura para melhorar o resultado de sua reconstrução mamária?

³De uma maneira geral, você está satisfeita com o resultado do enxerto de gordura em sua mama reconstruída?

⁴Você recomendaria o enxerto de gordura para uma amiga que está buscando melhorar o resultado de sua reconstrução mamária?

⁵Você tem o sentimento de que recebeu informações suficientes a respeito do enxerto de gordura que lhe permitiu tomar a decisão de fazer a cirurgia de refinamento de sua reconstrução mamária?

⁶Considerando o enxerto de gordura e o atual resultado, que nota de zero a dez você daria para a sua reconstrução mamária?

⁷Considerando o enxerto de gordura, demonstre o grau de satisfação com o resultado atual de sua reconstrução mamária

^bMann-Whitney, ^cExato de Fisher ou sua extensão

Anexo L – Tabela da distribuição da concordância e o coeficiente de concordância Kappa entre pares de avaliadores para as pacientes do dois grupos

	avaliadores	concordância observada	Kappa	IC*(Kappa)
tronco	1 x 2	0,639	0,302	-0,244 ; 0,848
	1 x 3	0,545	0,263	-0,258 ; 0,731
	1 x 4	0,545	0,068	-0,536 ; 0,671
	1 x 5	0,545	0,154	-0,394 ; 0,702
	2 x 3	0,455	0,029	-0,494 ; 0,553
	2 x 4	0,455	-0,320	-1,032 ; 0,392
	2 x 5	0,545	0,052	-0,562 ; 0,666
	3 x 4	0,545	0,018	-0,618 ; 0,654
	3 x 5	0,818	0,577	0,047 ; 1,107
controle	4 x 5	0,727	0,175	-0,621 ; 0,971
	1 x 2	0,625	0,415	-0,109 ; 0,938
	1 x 3	0,500	0,200	-0,354 ; 0,754
	1 x 4	0,375	0,000	-0,537 ; 0,537
	1 x 5	0,500	0,22	-0,321 ; 0,760
	2 x 3	0,875	0,771	0,352 ; 1,190
	2 x 4	0,375	0,000	-0,537 ; 0,537
	2 x 5	0,375	0,000	-0,537 ; 0,537
	3 x 4	0,375	0,000	-0,537 ; 0,537
Total	3 x 5	0,375	-0,026	-0,576 ; 0,525
	4 x 5	0,625	0,000	-0,895 ; 0,895
	1 x 2	0,632	0,373	0,003 ; 0,742
	1 x 3	0,526	0,223	-0,146 ; 0,591
	1 x 4	0,474	0,021	-0,397 ; 0,438
	1 x 5	0,526	0,193	-0,189 ; 0,576
	2 x 3	0,632	0,367	-0,006 ; 0,740
	2 x 4	0,421	-0,194	-0,652 ; 0,264
	2 x 5	0,474	0,059	-0,342 ; 0,461
	3 x 4	0,474	-0,061	-0,514 ; 0,391
	3 x 5	0,632	0,335	-0,057 ; 0,727
	4 x 5	0,684	0,042	-0,592 ; 0,676

*intervalo com 95% de confiança para o Kappa

Anexo M – Autorização da Revista *Regenerative Medicine*

Sam Cavana

Para: Luiz Alexandre Lorico Tissiani, Leela Ripton

RE: reprints request

10 de março de 2014 06:49

Caixa de Entrada - Gmail

SC

Dear Luiz,

We would be happy for you to use them in this instance with no charge.

Kind regards,

Sam

Sam Cavana

Reprint Sales Manager

future science group

tel: +44 (0)20 8371 6084 | fax: +44 (0)20 8371 6089 | www.future-science-group.com

email: s.cavana@future-science-group.com

Future Medicine Ltd, Unitec House, 2 Albert Place, London, N3 1QB, UK (registered in England & Wales, No: 4059017); VAT No: GB 833 0029 67

[Ver Tudo de CLINICA TISSIANI CIR PLASTICA](#)

Luiz Alexandre Lorico Tissiani

Para: reprints@futuremedicine.com

reprints request

9 de março de 2014 13:21

Todos os e-mails (Gmail) - Gmail (Todos os e-mails)

Hi Mr/Mrs

I'm a plastic surgeon in Sao Paulo, Brazil and I'm doing my doctorship in enriched fat grafts to reconstructed breasts.

Right now I'm writing the whole thesis and I would like to kindly request to use the pictures that illustrate the article published by Yoshimura, Suga and Eto in *Regen. Med.* **2009, 4(2): 265-273**, in the thesis; which is going to be presented in April/2014.

I appreciate your attention.

I look forward to hearing from you.

Thanks lot.

Best regards

Dr. Luiz Alexandre L. Tissiani

9 Referências

1. Alencar INdCJGd. Tipos de Câncer - Mama website: Ministério da Saúde - Brasil; 2015 [Available from: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/mama>.
2. Breastcancer.org. U.S. Breast Cancer Statistics <http://www.breastcancer.org>2015 [updated 11/5/2015. Available from: http://www.breastcancer.org/symptoms/understand_bc/statistics.
3. Albornoz CR, Bach PB, Mehrara BJ, Disa JJ, Pusic AL, McCarthy CM, et al. A paradigm shift in U.S. Breast reconstruction: increasing implant rates. *Plast Reconstr Surg*. 2013;131(1):15-23.
4. Shestak KC. *Reoperative Plastic Surgery of the Breast*. 1st ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2006. 497 p.
5. Kroll SS. Fat necrosis in free transverse rectus abdominis myocutaneous and deep inferior epigastric perforator flaps. *Plast Reconstr Surg*. 2000;106(3):576-83.
6. Illouz YG. Body contouring by lipolysis: a 5-year experience with over 3000 cases. *Plast Reconstr Surg*. 1983;72(5):591-7.
7. Spear SL, Howard MA, Boehmler JH, Ducic I, Low M, Abbruzzesse MR. The infected or exposed breast implant: management and treatment strategies. *Plast Reconstr Surg*. 2004;113(6):1634-44.
8. Spear SL, Wilson HB, Lockwood MD. Fat injection to correct contour deformities in the reconstructed breast. *Plast Reconstr Surg*. 2005;116(5):1300-5.
9. Rigotti G, Marchi A, Galiè M, Baroni G, Benati D, Krampera 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(5):1409-22; discussion 23-4.

10. Pérez-Cano R, Vranckx JJ, Lasso JM, Calabrese C, Merck B, Milstein AM, et al. Prospective trial of adipose-derived regenerative cell (ADRC)-enriched fat grafting for partial mastectomy defects: the RESTORE-2 trial. *Eur J Surg Oncol.* 2012;38(5):382-9.
11. Salgarello M, Visconti G, Barone-Adesi L. Fat grafting and breast reconstruction with implant: another option for irradiated breast cancer patients. *Plast Reconstr Surg.* 2012;129(2):317-29.
12. Serra-Renom JM, Muñoz-Olmo JL, Serra-Mestre JM. Fat grafting in postmastectomy breast reconstruction with expanders and prostheses in patients who have received radiotherapy: formation of new subcutaneous tissue. *Plast Reconstr Surg.* 2010;125(1):12-8.
13. Coleman SR, Saboeiro AP. Fat grafting to the breast revisited: safety and efficacy. *Plast Reconstr Surg.* 2007;119(3):775-85; discussion 86-7.
14. Khouri R, Del Vecchio D. Breast reconstruction and augmentation using pre-expansion and autologous fat transplantation. *Clin Plast Surg.* 2009;36(2):269-80, viii.
15. Losken A, Pinell XA, Sikoro K, Yezhelyev MV, Anderson E, Carlson GW. Autologous fat grafting in secondary breast reconstruction. *Ann Plast Surg.* 2011;66(5):518-22.
16. Doren EL, Parikh RP, Laronga C, Hiro ME, Sun W, Lee MC, et al. Sequelae of fat grafting postmastectomy: an algorithm for management of fat necrosis. *Eplasty.* 2012;12:e53.
17. Gentile P, Orlandi A, Scioli MG, Di Pasquali C, Bocchini I, Curcio CB, et al. A comparative translational study: the combined use of enhanced stromal vascular fraction and platelet-rich plasma improves fat grafting maintenance in breast reconstruction. *Stem Cells Transl Med.* 2012;1(4):341-51.
18. Sarfati I, Ihrai T, Kaufman G, Nos C, Clough KB. Adipose-tissue grafting to the post-mastectomy irradiated chest wall: preparing the ground for implant reconstruction. *J Plast Reconstr Aesthet Surg.* 2011;64(9):1161-6.
19. Coleman SR. Facial recontouring with lipostructure. *Clin Plast Surg.* 1997;24(2):347-67.
20. Karp NS, Choi M. Reply: The volumetric analysis of fat graft survival in breast reconstruction. *Plast Reconstr Surg.* 2013;132(4):669e.

21. Mu DL, Luan J, Mu L, Xin MQ. Breast augmentation by autologous fat injection grafting: management and clinical analysis of complications. *Ann Plast Surg.* 2009;63(2):124-7.
22. Matsumoto D, Sato K, Gonda K, Takaki Y, Shigeura T, Sato T, et al. Cell-assisted lipotransfer: supportive use of human adipose-derived cells for soft tissue augmentation with lipoinjection. *Tissue Eng.* 2006;12(12):3375-82.
23. Alderman AK, Wilkins EG, Lowery JC, Kim M, Davis JA. Determinants of patient satisfaction in postmastectomy breast reconstruction. *Plast Reconstr Surg.* 2000;106(4):769-76.
24. Dutra AK, Neto MS, Garcia EB, Veiga DF, Netto MM, Curado JH, et al. Patients' satisfaction with immediate breast reconstruction with a latissimus dorsi musculocutaneous flap. *J Plast Surg Hand Surg.* 2012;46(5):349-53.
25. Furlan V, Neto M, Abla L, Oliveira C, de Lima A, Ruiz B, et al. Qualidade de vida e auto-estima de pacientes mastectomizadas submetidas ou não à reconstrução de mama. *Rev Bras Cir Plast.* 2013.
26. Billings E, May JW. Historical review and present status of free fat graft autotransplantation in plastic and reconstructive surgery. *Plast Reconstr Surg.* 1989;83(2):368-81.
27. Lexer E. Free Transplantation. *Ann Surg* 1914. p. 166-94.
28. Neuhof H. The Transplantation of Tissues. monographs S, editor. New York: Appleton; 1923. 297 p.
29. Peer LA. Loss of weigh and volume in human fat grafts. With the postulation of a "Cell Surviving Theory". *Plast. Reconstr. Surg.*; 1950. p. 217-30.
30. Illouz YG. The fat cell "graft": a new technique to fill depressions. *Plast Reconstr Surg.* 1986;78(1):122-3.
31. Chajchir A, Benzaquen I. Liposuction fat grafts in face wrinkles and hemifacial atrophy. *Aesthetic Plast Surg.* 1986;10(2):115-7.
32. Matsudo PK, Toledo LS. Experience of injected fat grafting. *Aesthetic Plast Surg.* 1988;12(1):35-8.
33. Chajchir A, Benzaquen I. Fat-grafting injection for soft-tissue augmentation. *Plast Reconstr Surg.* 1989;84(6):921-34; discussion 35.

34. Hörl HW, Feller AM, Biemer E. Technique for liposuction fat reimplantation and long-term volume evaluation by magnetic resonance imaging. *Ann Plast Surg.* 1991;26(3):248-58.
35. Pereira LH, Radwanski HN. Fat grafting of the buttocks and lower limbs. *Aesthetic Plast Surg.* 1996;20(5):409-16.
36. Lambros V. Fat injection for the aging midface.: W.B. Saunders Company; 1998. p. 129-37.
37. de Benito J, Fernández I, Nanda V. Treatment of depressed scars with a dissecting cannula and an autologous fat graft. *Aesthetic Plast Surg.* 1999;23(5):367-70.
38. Witort EJ, Pattarino J, Papucci L, Schiavone N, Donnini M, Lapucci A, et al. Autologous lipofilling: coenzyme Q10 can rescue adipocytes from stress-induced apoptotic death. *Plast Reconstr Surg.* 2007;119(4):1191-9.
39. Niechajev I, Sevcuk O. Long-term results of fat transplantation: clinical and histologic studies. *Plast Reconstr Surg.* 1994;94(3):496-506.
40. Carpaneda CA, Ribeiro MT. Study of the histologic alterations and viability of the adipose graft in humans. *Aesthetic Plast Surg.* 1993;17(1):43-7.
41. Serra Renom JM, Munoz del Olmo JL, Gonzalo Caballero C. Uso de factores de crecimiento plaqueta unidos a injertos de grasa para lipofiling facial en ritidectomía. Julio-Agosto-Septiembre ed. Spain: Cir. Plas. Iberolatinoam.; 2006. p. 191-8.
42. Ullmann Y, Hyams M, Ramon Y, Beach D, Peled IJ, Lindenbaum ES. Enhancing the survival of aspirated human fat injected into nude mice. *Plast Reconstr Surg.* 1998;101(7):1940-4.
43. 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.
44. Eppley BL, Sidner RA, Platis JM, Sadove AM. Bioactivation of free-fat transfers: a potential new approach to improving graft survival. *Plast Reconstr Surg.* 1992;90(6):1022-30.
45. Ersek RA. Transplantation of purified autologous fat: a 3-year follow-up is disappointing. *Plast Reconstr Surg.* 1991;87(2):219-27; discussion 28.

46. Coleman SR. Long-term survival of fat transplants: controlled demonstrations. *Aesthetic Plast Surg.* 1995;19(5):421-5.
47. Fredricks S. Fat-Grafting injection for soft-tissue augmentation. Discussion.: *Plast Reconstr Surg*; 1989. p. 935.
48. Coleman SR. Hand rejuvenation with structural fat grafting. *Plast Reconstr Surg.* 2002;110(7):1731-44; discussion 45-7.
49. Boschert MT, Beckert BW, Puckett CL, Concannon MJ. Analysis of lipocyte viability after liposuction. *Plast Reconstr Surg.* 2002;109(2):761-5; discussion 6-7.
50. Rohrich RJ, Sorokin ES, Brown SA. In search of improved fat transfer viability: a quantitative analysis of the role of centrifugation and harvest site. *Plast Reconstr Surg.* 2004;113(1):391-5; discussion 6-7.
51. Allen RJ, Canizares O, Scharf C, Nguyen PD, Thanik V, Saadeh PB, et al. Grading lipoaspirate: is there an optimal density for fat grafting? *Plast Reconstr Surg.* 2013;131(1):38-45.
52. Kaufman MR, Bradley JP, Dickinson B, Heller JB, Wasson K, O'Hara C, et al. Autologous fat transfer national consensus survey: trends in techniques for harvest, preparation, and application, and perception of short- and long-term results. *Plast Reconstr Surg.* 2007;119(1):323-31.
53. Caviggioli F, Vinci V, Maione L, Lisa A, Klinger M. Autologous fat grafting in secondary breast reconstruction. *Ann Plast Surg.* 2013;70(1):119.
54. Cantarella G, Mazzola RF, Domenichini E, Arnone F, Maraschi B. Vocal fold augmentation by autologous fat injection with lipostructure procedure. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2005;132(2):239-43.
55. Klinger M, Marazzi M, Vigo D, Torre M. Fat injection for cases of severe burn outcomes: a new perspective of scar remodeling and reduction. *Aesthetic Plast Surg.* 2008;32(3):465-9.
56. Caviggioli F, Klinger F, Villani F, Fossati C, Vinci V, Klinger M. Correction of cicatricial ectropion by autologous fat graft. *Aesthetic Plast Surg.* 2008;32(3):555-7.
57. Jackson IT, Simman R, Tholen R, DiNick VD. A successful long-term method of fat grafting: recontouring of a large subcutaneous postradiation thigh defect with autologous fat transplantation. *Aesthetic Plast Surg.* 2001;25(3):165-9.

-
58. 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):211-28.
 59. 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.
 60. 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; discussion 6-7.
 61. Ashjian PH, De Ugarte DA, Katz AJ, Hedrick MH. Lipoplasty: from body contouring to tissue engineering. *Aesthet Surg J.* 2002;22(2):121-7.
 62. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell.* 2006;126(4):663-76.
 63. Mizuno H. Adipose derived stem cells for regenerative medicine in the field of plastic and reconstructive surgery. *Journal of Oral Biosciences: Elsevier*; 2013. p. 132-6.
 64. García-Olmo D, García-Arranz M, García LG, Cuellar ES, Blanco IF, Prianes LA, et al. Autologous stem cell transplantation for treatment of rectovaginal fistula in perianal Crohn's disease: a new cell-based therapy. *Int J Colorectal Dis.* 2003;18(5):451-4.
 65. García-Olmo D, García-Arranz M, Herreros D, Pascual I, Peiro C, Rodríguez-Montes JA. A phase I clinical trial of the treatment of Crohn's fistula by adipose mesenchymal stem cell transplantation. *Dis Colon Rectum.* 2005;48(7):1416-23.
 66. Garcia-Olmo D, Herreros D, Pascual I, Pascual JA, Del-Valle E, Zorrilla J, et al. Expanded adipose-derived stem cells for the treatment of complex perianal fistula: a phase II clinical trial. *Dis Colon Rectum.* 2009;52(1):79-86.
 67. Tanikawa DY, Agüena M, Bueno DF, Passos-Bueno MR, Alonso N. Fat grafts supplemented with adipose-derived stromal cells in the rehabilitation of patients with craniofacial microsomia. *Plast Reconstr Surg.* 2013;132(1):141-52.
 68. Friedenstein AJ, Petrakova KV, Kurolesova AI, Frolova GP. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation.* 1968;6(2):230-47.

-
69. Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet.* 1970;3(4):393-403.
 70. Peroni D, Scambi I, Pasini A, Lisi V, Bifari F, Krampera M, et al. Stem molecular signature of adipose-derived stromal cells. *Exp Cell Res.* 2008;314(3):603-15.
 71. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2006;8(4):315-7.
 72. Trojahn Kølle SF, Oliveri RS, Glovinski PV, Elberg JJ, Fischer-Nielsen A, Drzewiecki KT. Importance of mesenchymal stem cells in autologous fat grafting: a systematic review of existing studies. *J Plast Surg Hand Surg.* 2012;46(2):59-68.
 73. Philips BJ, Grahovac TL, Valentin JE, Chung CW, Bliley JM, Pfeifer ME, et al. Prevalence of endogenous CD34+ adipose stem cells predicts human fat graft retention in a xenograft model. *Plast Reconstr Surg.* 2013;132(4):845-58.
 74. Astori G, Vignati F, Bardelli S, Tubio M, Gola M, Albertini V, et al. "In vitro" and multicolor phenotypic characterization of cell subpopulations identified in fresh human adipose tissue stromal vascular fraction and in the derived mesenchymal stem cells. *J Transl Med.* 2007;5:55.
 75. 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(2):376-85.
 76. Yoshimura K, Shigeura T, Matsumoto D, Sato T, Takaki Y, Aiba-Kojima E, et al. Characterization of freshly isolated and cultured cells derived from the fatty and fluid portions of liposuction aspirates. *J Cell Physiol.* 2006;208(1):64-76.
 77. Faustini M, Bucco M, Chlapanidas T, Luccini G, Marazzi M, Tosca MC, et al. Nonexpanded mesenchymal stem cells for regenerative medicine: yield in stromal vascular fraction from adipose tissues. *Tissue Eng Part C Methods.* 2010;16(6):1515-21.
 78. Gimble JM, Katz AJ, Bunnell BA. Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circ Res.* 2007;100(9):1249-60.

-
79. Tissiani L, Agüena M, Passos-Bueno M, Alonso N. Effects of different liposuction techniques on the isolation of mesenchymal stem cells. *Rev. Bras. Cir. Plást.: Sociedade Brasileira de Cirurgia Plástica*; 2012. p. 509-13.
 80. Padoin AV, Braga-Silva J, Martins P, Rezende K, Rezende AR, Grechi B, et al. Sources of processed lipoaspirate cells: influence of donor site on cell concentration. *Plast Reconstr Surg*. 2008;122(2):614-8.
 81. Agüena 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.
 82. Zhu M, Zhou Z, Chen Y, Schreiber R, Ransom JT, Fraser JK, et al. Supplementation of fat grafts with adipose-derived regenerative cells improves long-term graft retention. *Ann Plast Surg*. 2010;64(2):222-8.
 83. 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.
 84. Yoshimura K, Suga H, Eto H. Adipose-derived stem/progenitor cells: roles in adipose tissue remodeling and potential use for soft tissue augmentation. *Regen Med*. 2009;4(2):265-73.
 85. 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.
 86. Kølke SF, Fischer-Nielsen A, Mathiasen AB, Elberg JJ, Oliveri RS, Glovinski PV, et al. Enrichment of autologous fat grafts with ex-vivo expanded adipose tissue-derived stem cells for graft survival: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet*. 2013;382(9898):1113-20.
 87. Bircoll M. Cosmetic breast augmentation utilizing autologous fat and liposuction techniques. *Plast Reconstr Surg*. 1987;79(2):267-71.
 88. Procedures AA-HCoN. Report on autologous fat transplantation. *Plast Surg Nurs*. 1987. p. 140-1.
 89. Brown FE, Sargent SK, Cohen SR, Morain WD. Mammographic changes following reduction mammoplasty. *Plast Reconstr Surg*. 1987;80(5):691-8.

-
90. Zheng DN, Li QF, Lei H, Zheng SW, Xie YZ, Xu QH, et al. Autologous fat grafting to the breast for cosmetic enhancement: experience in 66 patients with long-term follow up. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. 2008;61(7):792-8.
 91. Zocchi ML, Zuliani F. Bicompartmental breast lipostructuring. *Aesthetic Plast Surg*. 2008;32(2):313-28.
 92. Illouz YG, Sterodimas A. Autologous fat transplantation to the breast: a personal technique with 25 years of experience. *Aesthetic Plast Surg*. 2009;33(5):706-15.
 93. Khouri RK, Eisenmann-Klein M, Cardoso E, Cooley BC, Kacher D, Gombos E, et al. Brava and autologous fat transfer is a safe and effective breast augmentation alternative: results of a 6-year, 81-patient, prospective multicenter study. *Plast Reconstr Surg*. 2012;129(5):1173-87.
 94. Kamakura T, Ito K. Autologous cell-enriched fat grafting for breast augmentation. *Aesthetic Plast Surg*. 2011;35(6):1022-30.
 95. Li FC, Chen B, Cheng L. Breast augmentation with autologous fat injection: a report of 105 cases. *Ann Plast Surg*. 2014;73 Suppl 1:S37-42.
 96. 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.
 97. Hyakusoku H, Ogawa R, Ono S, Ishii N, Hirakawa K. Complications after autologous fat injection to the breast. *Plast Reconstr Surg*. 2009;123(1):360-70; discussion 71-2.
 98. Kanchwala SK, Glatt BS, Conant EF, Bucky LP. Autologous fat grafting to the reconstructed breast: the management of acquired contour deformities. *Plast Reconstr Surg*. 2009;124(2):409-18.
 99. de Blacam C, Momoh AO, Colakoglu S, Tobias AM, Lee BT. Evaluation of clinical outcomes and aesthetic results after autologous fat grafting for contour deformities of the reconstructed breast. *Plast Reconstr Surg*. 2011;128(5):411e-8e.
 100. Missana MC, Laurent I, Barreau L, Balleyguier C. Autologous fat transfer in reconstructive breast surgery: indications, technique and results. *Eur J Surg Oncol*. 2007;33(6):685-90.

-
101. Panettiére P, Marchetti L, Accorsi D. The serial free fat transfer in irradiated prosthetic breast reconstructions. *Aesthetic Plast Surg.* 2009;33(5):695-700.
 102. Gutowski KA, Force AFGT. Current applications and safety of autologous fat grafts: a report of the ASPS fat graft task force. *Plast Reconstr Surg.* 2009;124(1):272-80.
 103. Stem cells in aesthetic surgery promising, but marketing claims are too far ahead of the science. [press release]. Boston 2011.
 104. Kling RE, Mehrara BJ, Pusic AL, Young VL, Hume KM, Crotty CA, et al. Trends in autologous fat grafting to the breast: a national survey of the american society of plastic surgeons. *Plast Reconstr Surg.* 2013;132(1):35-46.
 105. Rubin JP, Coon D, Zuley M, Toy J, Asano Y, Kurita M, et al. Mammographic changes after fat transfer to the breast compared with changes after breast reduction: a blinded study. *Plast Reconstr Surg.* 2012;129(5):1029-38.
 106. Rigotti G, Marchi A, Stringhini P, Baroni G, Galiè M, Molino AM, et al. Determining the oncological risk of autologous lipoaspirate grafting for post-mastectomy breast reconstruction. *Aesthetic Plast Surg.* 2010;34(4):475-80.
 107. Rietjens M, De Lorenzi F, Rossetto F, Brenelli F, Manconi A, Martella S, et al. Safety of fat grafting in secondary breast reconstruction after cancer. *J Plast Reconstr Aesthet Surg.* 2011;64(4):477-83.
 108. Petit JY, Lohsiriwat V, Clough KB, Sarfati I, Ihrai T, Rietjens M, et al. The oncologic outcome and immediate surgical complications of lipofilling in breast cancer patients: a multicenter study--Milan-Paris-Lyon experience of 646 lipofilling procedures. *Plast Reconstr Surg.* 2011;128(2):341-6.
 109. Petit JY, Botteri E, Lohsiriwat V, Rietjens M, De Lorenzi F, Garusi C, et al. Locoregional recurrence risk after lipofilling in breast cancer patients. *Ann Oncol.* 2012;23(3):582-8.
 110. Regolo L, Galli L, Petrolo G, Scoccia E, De Simone A, Fissi S, et al. Short commentaries on data published by Petit et al. on locoregional risk after lipofilling in breast cancer patients. *Breast.* 2013;22(1):96-7.
 111. Riggio E, Bordoni D, Nava MB. Oncologic surveillance of breast cancer patients after lipofilling. *Aesthetic Plast Surg.* 2013;37(4):728-35.

-
112. Seth AK, Hirsch EM, Kim JY, Fine NA. Long-term outcomes following fat grafting in prosthetic breast reconstruction: a comparative analysis. *Plast Reconstr Surg*. 2012;130(5):984-90.
 113. Petit JY, Rietjens M, Botteri E, Rotmensz N, Bertolini F, Curigliano G, et al. Evaluation of fat grafting safety in patients with intraepithelial neoplasia: a matched-cohort study. *Ann Oncol*. 2013;24(6):1479-84.
 114. Krastev TK, Jonasse Y, Kon M. Oncological safety of autologous lipoaspirate grafting in breast cancer patients: a systematic review. *Ann Surg Oncol*. 2013;20(1):111-9.
 115. Krumboeck A, Giovanoli P, Plock JA. Fat grafting and stem cell enhanced fat grafting to the breast under oncological aspects--recommendations for patient selection. *Breast*. 2013;22(5):579-84.
 116. Karnoub AE, Dash AB, Vo AP, Sullivan A, Brooks MW, Bell GW, et al. Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. *Nature*. 2007;449(7162):557-63.
 117. Martin-Padura I, Gregato G, Marighetti P, Mancuso P, Calleri A, Corsini C, 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.
 118. Qiao L, Xu ZL, Zhao TJ, Ye LH, Zhang XD. Dkk-1 secreted by mesenchymal stem cells inhibits growth of breast cancer cells via depression of Wnt signalling. *Cancer Lett*. 2008;269(1):67-77.
 119. Otsu K, Das S, Houser SD, Quadri SK, Bhattacharya S, Bhattacharya J. Concentration-dependent inhibition of angiogenesis by mesenchymal stem cells. *Blood*. 2009;113(18):4197-205.
 120. Casiraghi F, Remuzzi G, Abbate M, Perico N. Multipotent mesenchymal stromal cell therapy and risk of malignancies. *Stem Cell Rev*. 2013;9(1):65-79.
 121. Pearl RA, Leedham SJ, Pacifico MD. The safety of autologous fat transfer in breast cancer: lessons from stem cell biology. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. 2012;65(3):283-8.
 122. Pavy JJ, Denekamp J, Letschert J, Littbrand B, Mornex F, Bernier J, et al. EORTC Late Effects Working Group. Late Effects toxicity scoring: the SOMA scale. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1995;31(5):1043-7.

-
123. Hulley SB, Cummings SR, Browner WS, Grady DG, TB N. Delineando a pesquisa clínica - uma abordagem epidemiológica: Artmed; 2008. 384 p.
 124. Mori F, Quattrini Li A, Mori A, Lo Russo G. Fat transfer for breast reconstruction: three-dimensional ligamentous band release using a Tuohy needle. *Plast Reconstr Surg*. 2013;132(3):480e-1e.
 125. Herold C, Ueberreiter K, Busche MN, Vogt PM. Autologous fat transplantation: volumetric tools for estimation of volume survival. A systematic review. *Aesthetic Plast Surg*. 2013;37(2):380-7.
 126. Bussab WO, Morettin PA. Estatística básica. 5a. ed. São Paulo: Editora Saraiva; 2006. 540 p.
 127. Siegel S, Castellan Jr NJ. Estatística não-paramétrica para ciências do comportamento. 2a. ed. Porto Alegre: Artmed; 2006.
 128. Agresti A. Categorical data analysis. 2nd ed. New York: Wiley-Interscience; 2002. 734 p.
 129. Coleman SR. Structural fat grafting: more than a permanent filler. *Plast Reconstr Surg*. 2006;118(3 Suppl):108S-20S.
 130. Del Vecchio D, Rohrich RJ. A classification of clinical fat grafting: different problems, different solutions. *Plast Reconstr Surg*. 2012;130(3):511-22.
 131. Spear SL, Pittman T. A prospective study on lipoaugmentation of the breast. *Aesthet Surg J*. 2014;34(3):400-8.
 132. Del Vecchio DA, Del Vecchio SJ. The Graft-to-Capacity Ratio: Volumetric Planning in Large-Volume Fat Transplantation. *Plast Reconstr Surg*. 2014;133(3):561-9.
 133. Sinna R, Delay E, Garson S, Delaporte T, Toussoun G. Breast fat grafting (lipomodelling) after extended latissimus dorsi flap breast reconstruction: a preliminary report of 200 consecutive cases. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. 2010;63(11):1769-77.
 134. Khouri RK, Rigotti G, Cardoso E, Marchi A, Rotemberg SC, Baker TJ, et al. Tissue-engineered breast reconstruction with Brava-assisted fat grafting: a 7-year, 488-patient, multicenter experience. *Plast Reconstr Surg*. 2015;135(3):643-58.

-
135. Longo B, Laporta R, Sorotos M, Pagnoni M, Gentilucci M, Santanelli di Pompeo F. Total breast reconstruction using autologous fat grafting following nipple-sparing mastectomy in irradiated and non-irradiated patients. *Aesthetic Plast Surg*. 2014;38(6):1101-8.
 136. Downs SH BN. The feasibility of creating a checklist for the assessment of the methodological quality both of randomised and non-randomised studies of health care interventions. *J Epidemiol Community Health* 1998. p. 377-84.
 137. Ihrai T, Georgiou C, Machiavello JC, Chignon-Sicard B, Figl A, Raoust I, et al. Autologous fat grafting and breast cancer recurrences: retrospective analysis of a series of 100 procedures in 64 patients. *J Plast Surg Hand Surg*. 2013;47(4):273-5.
 138. Gale KL, Rakha EA, Ball G, Tan VK, McCulley SJ, Macmillan RD. A case-controlled study of the oncologic safety of fat grafting. *Plast Reconstr Surg*. 2015;135(5):1263-75.
 139. Zimmerlin L, Donnenberg AD, Rubin JP, Basse P, Landreneau RJ, Donnenberg VS. Regenerative therapy and cancer: in vitro and in vivo studies of the interaction between adipose-derived stem cells and breast cancer cells from clinical isolates. *Tissue Eng Part A*. 2011;17(1-2):93-106.
 140. Kucerova L, Skolekova S, Matuskova M, Bohac M, Kozovska Z. Altered features and increased chemosensitivity of human breast cancer cells mediated by adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells. *BMC Cancer*. 2013;13:535.
 141. Del Vecchio DA, Bucky LP. Breast augmentation using preexpansion and autologous fat transplantation: a clinical radiographic study. *Plast Reconstr Surg*. 2011;127(6):2441-50.
 142. Edsander-Nord A, Wickman M, Jurell G. Measurement of breast volume with thermoplastic casts. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg*. 1996;30(2):129-32.
 143. Losken A, Seify H, Denson DD, Paredes AA, Carlson GW. Validating three-dimensional imaging of the breast. *Ann Plast Surg*. 2005;54(5):471-6; discussion 7-8.
 144. Kovacs L, Eder M, Hollweck R, Zimmermann A, Settles M, Schneider A, et al. Comparison between breast volume measurement using 3D surface imaging and classical techniques. *Breast*. 2007;16(2):137-45.

-
145. Mizuno H, Hyakusoku H. Fat grafting to the breast and adipose-derived stem cells: recent scientific consensus and controversy. *Aesthet Surg J*. 2010;30(3):381-7.
 146. Peltoniemi HH, Salmi A, Miettinen S, Mannerström B, Saariniemi K, Mikkonen R, et al. Stem cell enrichment does not warrant a higher graft survival in lipofilling of the breast: a prospective comparative study. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. 2013;66(11):1494-503.
 147. 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.
 148. Yang JD, Kim MC, Lee JW, Cho YK, Choi KY, Chung HY, et al. Usefulness of Oncoplastic Volume Replacement Techniques after Breast Conserving Surgery in Small to Moderate-sized Breasts. *Arch Plast Surg*. 2012;39(5):489-96.
 149. Parikh RP, Doren EL, Mooney B, Sun WV, Laronga C, Smith PD. Differentiating fat necrosis from recurrent malignancy in fat-grafted breasts: an imaging classification system to guide management. *Plast Reconstr Surg*. 2012;130(4):761-72.
 150. 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):360-76.
 151. Kaoutzanis C, Xin M, Ballard TN, Welch KB, Momoh AO, Kozlow JH, et al. Autologous Fat Grafting After Breast Reconstruction in Postmastectomy Patients: Complications, Biopsy Rates, and Locoregional Cancer Recurrence Rates. *Ann Plast Surg*. 2015.
 152. Yamaguchi M, Matsumoto F, Bujo H, Shibasaki M, Takahashi K, Yoshimoto S, et al. Revascularization determines volume retention and gene expression by fat grafts in mice. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2005;230(10):742-8.
 153. 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(5):1081-92.
 154. Yoshimura K, Aoi N, Suga H, Inoue K, Eto H, Sato K, et al. Ectopic fibrogenesis induced by transplantation of adipose-derived progenitor cell suspension immediately after lipoinjection. *Transplantation*. 2008;85(12):1868-9.

-
155. Planat-Benard V, Silvestre JS, Cousin B, André M, Nibbelink M, Tamarat R, et al. Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives. *Circulation*. 2004;109(5):656-63.
 156. Hong SJ, Traktuev DO, March KL. Therapeutic potential of adipose-derived stem cells in vascular growth and tissue repair. *Curr Opin Organ Transplant*. 2010;15(1):86-91.
 157. Rehman J, Traktuev D, Li J, Merfeld-Clauss S, Temm-Grove CJ, Bovenkerk JE, et al. Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. *Circulation*. 2004;109(10):1292-8.

Apêndices

Apêndice 1 – Autorização da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP

CONSELHO NACIONAL DE SAÚDE
COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA

PARECER N°. 238/2011

Registro CONEP 16086 (Este n° deve ser citado nas correspondências referentes a este projeto)

FR – 334585 **Processo nº 25000.137688/2010-93**

Projeto de Pesquisa: *"O impacto da imunofenotipagem das células-tronco mesenquimais presentes na fração vâsculo-estromal do tecido adiposo na lipoenxertia autóloga em pacientes submetidas a refinamentos de reconstrução mamária".*

Pesquisador Responsável: Dr. Nivaldo Alonso

Instituição: Hospital Municipal Dr. Cármino Caricchio (**CENTRO ÚNICO**)

CEP de origem: da instituição

Área Temática Especial: Novos procedimentos

Patrocinador: será solicitado recurso para FAPESP

Sumário geral do protocolo

Os métodos atuais de reconstrução mamária pós-mastectomia empregam tecidos autólogos (retalhos) e materiais aloplásticos (implantes mamários, expansores de tecido e implantes expansores). Entretanto, é consenso na literatura que, independentemente do método utilizado, em certos casos haverá a necessidade de se corrigir as deformidades de contorno causadas pela insuficiência volumétrica do método ou mesmo por perdas parciais teciduais de retalhos empregados.

Incluem as opções cirúrgicas para a correção das deformidades de contorno os retalhos de salvamento, os implantes complementares e os lipoenxertos. Em relação aos lipoenxertos; diferentes métodos de obtenção, preparo e enxertia, cujo objetivo final é aumentar a integração dos adipócitos enxertados. Entretanto, nenhum método foi capaz de evitar a ocorrência do fenômeno da absorção a que todos os lipoenxertos estão sujeitos. Desta maneira, pode-se dizer que as taxas de integração dos enxertos de gordura foram e ainda são as mais variadas possíveis, sendo diretamente dependentes do cirurgião e da técnica empregada.

O método desenvolvido por Sydney Coleman, chamado de lipoenxertia estruturada, representa um marco na história da lipoenxertia, pois foi o primeiro a incorporar uma metodização de obtenção, processamento e enxertia. Este método é absolutamente reprodutível e capaz de promover resultados consistentes no longo prazo quando comparado a outros métodos. Segundo Coleman, a obtenção da gordura deve ser realizada com baixas pressões e o preparo utiliza uma centrífuga simples que separa o óleo, os adipócitos e a solução de infiltração com sangue. A enxertia estruturada preconiza que todas as células a serem enxertadas estejam próximas de um capilar de maneira a receber embebição plasmática. Portanto, múltiplos túneis de enxertia devem ser realizados a fim de se depositar pequenas alíquotas de gordura em cada um deles.

As células-tronco presentes na fração vâsculo-estromal (FVE) do tecido adiposo vem sendo estudadas e utilizadas numa grande quantidade de experimentos e situações clínicas distintas. As células-tronco mesenquimais presentes na FVE do tecido adiposo tem a capacidade de aderir ao plástico, expressar antígenos de superfície específicos e apresentar potencial de diferenciação multipotente. De maneira que, quando cultivadas em meios indutores específicos, estas células podem se diferenciar em adipócitos,

1/5lc/os/gil/ds

Cont. Parecer CONEP nº. 238/2011

condrócitos, osteoblastos, células musculares, neurônios e células endoteliais. Os antígenos de superfície expressos pelas células-tronco são proteínas existentes na membrana celular e são específicos de cada linhagem. As células-tronco hematopoiéticas expressam os marcadores CD34, CD45, CD90 e CD13. As células endoteliais expressam, dentre outros, os antígenos CD31, CD146 e o UEA-1. As células-tronco mesenquimais expressam diversos marcadores como o CD13, CD29, CD44, CD73, CD90, CD105 e CD166.

Para cada 4800 células presentes na FVE do tecido adiposo, uma é de linhagem mesenquimal, ocorrência sete vezes superior a da medula óssea¹. Na fração vâsculo-estromal do tecido adiposo de camundongos, uma subpopulação de células-tronco mesenquimais capazes de se diferenciar em adipócitos e de formar um tecido adiposo estruturalmente completo, maduro e funcional quando enxertadas no paramétrio de camundongos lipodistróficos. O enriquecimento dos enxertos de gordura com células-tronco mesenquimais provenientes do tecido adiposo aumenta a taxa de sobrevivência e permanência destes enxertos. Entretanto, não está claro se, em humanos, a população total de células-tronco mesenquimais presentes na FVE ou apenas uma ou mais linhagens celulares são decisivas na melhoria da integração dos lipoenxertos.

O objetivo principal deste estudo é "comparar, na passagem zero (P0), a proporção relativa de células-tronco mesenquimais do tecido adiposo que enriquecem enxertos de gordura e a eficiência da correção cirúrgica de irregularidades de contorno em pacientes submetidas à reconstrução mamária".

O estudo será formado por dois grupos compostos por pacientes, que foram submetidas à reconstrução mamária tardia, após mastectomia por câncer de mama e que apresentam irregularidade de contorno. Como método de correção e, para obter-se melhoria estética do resultado alcançado, estas pacientes foram selecionadas para ser submetidas ao procedimento de lipoenxertia. O primeiro grupo, chamado de controle e composto por 10 pacientes, será submetido, apenas, à lipoenxertia pelo método Coleman, sem o enriquecimento com as células-tronco. O segundo grupo, objeto do estudo e composto por 10 pacientes, será submetido à lipoenxertia pelo método Coleman, entretanto, o enxerto será enriquecido com as células-tronco mesenquimais provenientes da fração vâsculo-estromal do tecido adiposo localizado no abdome, flancos e coxas. Serão excluídos do estudo os sujeitos que apresentarem irregularidades de contorno, mas cujo leito receptor não apresente adequadas condições para nutrição dos enxertos e os sujeitos muito magros que não apresentem áreas doadoras de gordura o suficiente para preencher os pré-requisitos.

Os dados de identificação, antecedentes pessoais e familiares, volumetria, intra-operatórios, evolução clínica, contagem celular e de imunofenotipagem serão inseridos em uma ficha de coleta de dados. A análise volumétrica da mama tratada será realizada antes e depois de seis meses da lipoenxertia, empregando-se ressonância nuclear magnética das mamas e programa para a análise do volume mamário.

A área doadora de gordura será previamente infiltrada com uma solução de soro fisiológico com adrenalina na concentração 1:500.000. A esta gordura, previamente preparada, serão adicionadas as células presentes na fração vâsculo-estromal na proporção de 1:2. Para cada 1 ml de gordura centrifugada pronta para a lipoenxertia, 2 ml de gordura centrifugada serão utilizados para a obtenção das células da fração vâsculo-estromal.

Local de realização

Trata-se de um projeto nacional e unicêntrico.

Cont. Parecer CONEP nº. 238/2011

Apresentação do protocolo

A folha de rosto (página 01, numeração do CEP) onde informa que será formado um banco de materiais biológicos.

O cronograma (página 12, numeração do CEP) informa que o estudo se iniciou em abril de 2010 e tem previsão para terminar em outubro de 2011.

O orçamento (página 13, numeração do CEP) está estimado em R\$ 29000,00 reais sendo que o pesquisador irá após a tramitação pelo sistema CEP/CONEP solicitar um auxílio regular da FAPESP.

O TCLE foi escrito na forma de convite e está anexado nas páginas 18 e 19 (numeração do CEP).

Considerações sobre a análise das respostas ao Parecer CONEP Nº 602/2010, relativo ao projeto de pesquisa em questão:

1. De acordo com o cronograma anexado, a pesquisa já se iniciou, visto que o protocolo ainda encontra-se em tramitação pelo sistema CEP/CONEP, solicita-se que o cronograma seja adequado.

Resposta: O projeto ainda não teve início aguardando a autorização da Comissão de Ética em Pesquisa do Hospital Tatuapé e também da CONEP, entretanto o cronograma enviado como pré-requisito e também como planejamento de atividades.

Análise: Pendência atendida

2. Consta na folha de rosto que será feito um banco de materiais biológicos. Solicita-se portando que o pesquisador justifique a necessidade destas amostras para uso futuro e descreva onde serão armazenadas, com que propósito, com que termo de doação. Solicita-se esclarecimento e, em havendo formação de banco, cumprimento da Resolução CNS 347/05.

Resposta: Aliquotas de células-tronco mesenquimais isoladas do tecido adiposo de cada paciente serão congeladas e armazenadas em nitrogênio líquido devidamente identificadas, para, caso necessário, as imunofenotipagens tenham que ser repetidas ou para confirmação de resultados ou mesmo por possíveis danos técnicos que possam ocorrer com o material durante o processamento. Todas as alíquotas armazenadas em nitrogênio líquido serão descartadas após o término do estudo. O armazenamento está informado no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) atualizado.

Análise: Pendência atendida

3. Não consta no protocolo a brochura do investigador onde são apresentados com detalhes os estudos anteriores acrescidos de uma análise crítica, que possam justificar científica e eticamente o presente projeto. Uma das partes importantes é a análise de segurança dos estudos anteriores para que se possa realizar uma ponderação adequada de riscos e benefícios (princípio da beneficência). Solicita-se adequação.

Resposta: Abaixo seguem referências bibliográficas nacionais e internacionais que mostram o emprego clínico das células-tronco mesenquimais em cirurgia plástica de aumento mamário primário, em cirurgia plástica de aumento mamário após a remoção de implantes mamários (aumento mamário secundário ou de resgate), no tratamento da seqüela da radioterapia para o tratamento do câncer de mama, para o tratamento de fístula retovaginal na doença de Crohn e no tratamento de ríides faciais. Tais estudos mostram a segurança do uso clínico de células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo injetadas isoladamente ou em combinação com ácido hialurônico ou mesmo enriquecendo enxertos de gordura. O pesquisador responsável, Dr. Nivaldo Alonso, apresenta, concomitantemente,

Cont. Parecer CONEP nº. 238/2011

outros projetos envolvendo o uso clínico de células-tronco derivadas do tecido adiposo (folhas de rosto do SINEP em anexo).

3.1- Silva CC, Baptista LS, Carias RBV, Menezes Neto HC. Cultura autóloga de células-tronco mesenquimais de tecido adiposo para o tratamento de ríides faciais. Ver Col Bras Cir 2009; 36(4): 288-291.

3.2- Yoshimura K, Asano Y, Aoi Noriyuki, Kurita M, Oshima Y, Sato K, Inoue K, Suga H, Eto H, Kato H e Harii K. Progenitor-enriched adipose tissue transplantation as rescue for breast implant complications. The Breast Journal 2010; 16(20): 169-175.

3.3- Yoshimura K, Sato k, Aoi N, Kurita M, Hiroshi T e Harii k. Cell-assisted lipotransfer for cosmetic breast argumentation: supportie use of adipose-derived stem/stromal cells. Aesth Plast Surg 2008; 32;48-55.

3.4- Garcia-OlmoD, Carcia-Arranz M, Garcia LG, Cuellar ES, Blanco IF, Prianes LA e Garcia-Sancho L. Autologous stem cell transplantation for treatment of rectovaginal fistula in perianal Chron's disease: a new cell-based therapy. Int J Colorectal Dis 2003; 18: 451-454.

3.5- Rigotti G, marchi A, Galie M, Baroni G e Sbarbati A. Clinical treatmente of radiotherapy tissue damage by lipoaspirate transplant: a healing process mediated by adipose-derived adult stem cells. Plast Recons Surg 2007; 119(5): 1409-1422.

Análise: Pendência atendida.

4. Não há informação sobre onde e como as pacientes serão atendidas em caso de efeito adverso. Solicita-se adequação.

Resposta: As pacientes caso necessitem e em decorrência de intercorrências, serão atendidas no Hospital onde será realizado o presente projeto: Hospital Municipal Dr. Carmino Caricchio/Hospital Tatuapé/SMS-SP.

Análise: Pendência atendida

5. Em relação ao TCLE:

- a. Não está redigido em forma de convite a participação. Não dá idéia do que é o projeto, do que são os objetivos, análise de riscos e benefícios, a relevância e justificativa, além dos procedimentos, resultados esperados outras pesquisas realizadas. Solicita-se adequação.
- b. Não consta garantia de assistência integral e indenização em caso de danos decorrentes da participação do sujeito no estudo, assim como a identificação do responsável pela assistência, conforme exigido pelos itens IV.1."i", IV.1."d", V.5 e V.6 da Resolução CNS 196/96. Solicita-se adequação.
- c. Como prevêem os itens IV.1."h" e VI.3."h" da Resolução CNS 196/96, deve ser garantido ao sujeito de pesquisa o ressarcimento de despesas decorrentes da participação no estudo, tais como transporte e alimentação nos dias em que for necessária sua presença. Assim sendo, solicita-se que a garantia de ressarcimento dos gastos decorrentes da participação no estudo seja apresentada de modo claro e afirmativo. Solicita-se adequação.
- d. Não consta a informação de que será emitido em duas vias, ficando uma com o pesquisador e outra com o sujeito de pesquisa (item IV.2."d" da Resolução CNS 196/96). Solicita-se adequação.
- e. Como forma de contato com os pesquisadores somente é informado um telefone sem DDD. Solicita-se que seja incluído também o endereço onde o sujeito de pesquisa possa encontrar os mesmos que seja 24 horas para contato em caso de urgência.
- f. Não foi informada nenhuma forma de contato com o CEP. Solicita-se que seja incluído no TCLE telefone e endereço deste para que o sujeito de pesquisa possa entrar em contato caso precise.

Cont. Parecer CONEP nº. 238/2011

Resposta: Todas as alterações sugeridas ao TCLE foram devidamente introduzidas e o mesmo, na sua forma atualizada, encontra-se anexado a esta resposta.

Análise da nova versão: Ainda não está adequado. O TCLE é um documento em que o pesquisador, em linguagem clara e acessível, apresenta os objetivos, a justificativa, a relevância, os procedimentos, conforme resolução 196/96 capítulo IV. Essas exigências são incompatíveis com a redação em primeira pessoa como apresentado. O autor do TCLE não é o sujeito de pesquisa e sim o pesquisador. A recomendação prática para a redação do TCLE é a de reproduzir uma conversa com o sujeito de pesquisa. Os objetivos colocados nessa última versão não se encontram em linguagem adequada. **Pendência não atendida.** Solicita-se adequação.

Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 196/96, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto, devendo o CEP verificar o cumprimento da questão 05 acima, antes do início do estudo.

Situação: **Protocolo aprovado com recomendação.**

Brasília, 25 de março de 2011.

Oyselle Saddi Fannous
Coordenadora da CONEP/CNS/MS

Apêndice 2 - Autorização do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – FMUSP

CIÊNCIA

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em **14.12.11** tomou ciência do Projeto nº **498/11** intitulado **“O impacto da imunofenotipagem das células-tronco mesenquimais presentes na fração vaso-estromal do tecido adiposo na lipoenxertia autóloga em pacientes submetidas a refinamentos de reconstrução mamária”**, vinculado à pós-graduação do Departamento de Cirurgia que não envolverá atividade prática e/ou experimental no âmbito da Faculdade de Medicina ou Instituto do Câncer do Estado de São Paulo e que conta com prévia aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Municipal “Dr. Cármino Caricchio-Tatuapé, onde o projeto será executado.

Pesquisador(a) Responsável: Nivaldo Alonso

Pesquisador(a) Executante : Luiz Alexandre Lorico Tissiani

CEP-FMUSP, 14 de dezembro de 2011.

Prof. Dr. Paulo Eurípedes Marchiori
Vice-Coordenador interino
Comitê de Ética em Pesquisa

Apêndice 3 - Autorização do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Carmino Caricchio – HMCC

PREFEITURA DE SÃO PAULO SAÚDE	Prefeitura de São Paulo Secretaria Municipal de Saúde Autarquia Hospitalar Municipal Hospital Municipal “Dr. Cármino Caricchio”	CEP HMCC TATUAPÉ 2004
--	--	---

São Paulo, 25 de abril de 2011.

**Ilmº Sr.
Prof. Dr. Nivaldo Alonso
Instituto de Ciências Biomédicas da USP – ICB/USP**

Referente: Projeto de Pesquisa: - **“O impacto da imunofenotipagem das células-tronco mesenquimais presentes na fração vâsculo-estromal do tecido adiposo na lipoenxertia autóloga em pacientes submetidas a refinamentos de reconstrução mamária”**

Registro CEP-HMCC/Tatuapé:- **007/10** .SISNEPAAE:- **334585**

Prezado(a) Senhor(a)

O Comitê de Ética em Pesquisa do **Hospital Municipal “Dr. Cármino Caricchio” –HMCC / Tatuapé**, analisou o Projeto de Pesquisa acima citado, considerando-o como **APROVADO** em 25/04/2011.

Lembramos que cabe ao pesquisador elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios semestrais e no final o exemplar do trabalho conclusivo, de acordo com a *Resolução 196/96* do Conselho Nacional de Saúde, item IX.2 letra c.

O Primeiro relatório está previsto para 25/10/2011.

Atenciosamente

Prof. Dr. Juang Horng Jyh
Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital Municipal “Dr. Cármino Caricchio” – HMCC / Tatuapé

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA HMCC- TATUAPÉ
10º ANDAR / RAMAL 3518