

MAYARA MYTZI DE AQUINO SILVA

**ENXERTO DE GORDURA EM MODELO DE
NEOPLASIA MAMÁRIA RESIDUAL EM
CAMUNDONGOS.**

**Tese apresentada à Universidade Federal de
São Paulo para obtenção do Título de Doutor
em Ciências**

**SÃO PAULO
2018**

MAYARA MYTZI DE AQUINO SILVA

**ENXERTO DE GORDURA EM MODELO DE
NEOPLASIA MAMÁRIA RESIDUAL EM
CAMUNDONGOS.**

Orientador: Prof. Dr. MIGUEL SABINO NETO

Coorientador: Prof. JOSEPH PETER RUBIN

SÃO PAULO

2018

Silva, Mayara Mytzi de Aquino

Enxerto de gordura em modelo de neoplasia mamária residual em camundongos.

/ Mayara Mytzi de Aquino Silva. -- São Paulo, 2018.
xx, 156f.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Translacional.

Título em inglês: Fat graft in a model of residual mammary neoplasia in mice.

1. Neoplasias mamárias experimentais. 2. Gordura subcutânea. 3. Mamoplastia. 4. Transplante de tecidos. 5. Neoplasias da mama.



**UNIVERSIDADE FEDERAL
DE SÃO PAULO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM CIRURGIA TRANSLOCACIONAL**

Coordenação: Profa. Dra. Lydia Masako Ferreira

ORIENTADOR: Prof. Dr. MIGUEL SABINO NETO

COORIENTADOR: Prof. JOSEPH PETER RUBIN

2018

DEDICATÓRIA

*A Deus, pelos dons da vida, da sabedoria e da perseverança, por cada dia
dessa jornada, por cada sucesso e cada decepção.*

*À minha querida mãe, Sônia, fonte principal de inspiração e força, maior
incentivadora de todos os meus projetos desde sempre.*

*Ao meu pai, Gilberto, pelo apoio incondicional e pelas palavras de
resignação e sensatez.*

*Ao meu irmão, José Ribamar, cujos passos sigo desde criança, meu
exemplo maior de caráter e dedicação.*

*Ao meu namorado, William, companheiro de todas as horas, por acreditar
nos meus sonhos e persegui-los com determinação e paciência ao meu
lado.*

*Ao meu caro orientador, Prof. Dr. Miguel Sabino Neto, por ser minha
maior referência profissional e por dar crédito às minhas aspirações
acadêmicas e guiar-me de forma atenciosa e justa, a fim de alcançá-las.*

AGRADECIMENTOS

À Prof^a. Dra. **LYDIA MASAKO FERREIRA**, Professora Titular da Disciplina de Cirurgia Plástica do Departamento de Cirurgia da Universidade Federal de São Paulo, Chefe da Disciplina de Cirurgia Plástica da Universidade Federal de São Paulo, por abrir um brilhante caminho para esta disciplina e este programa de pós-graduação, e por ser um exemplo constante de dinamismo profissional e incansável busca pelo progresso.

Ao Prof. Dr. **MIGUEL SABINO NETO**, Professor Livre Docente da Disciplina de Cirurgia Plástica do Departamento de Cirurgia da Universidade Federal de São Paulo, orientador desta tese, pela valiosa orientação, disponibilidade constante, apoio incondicional e por partilhar sua experiência e seu conhecimento comigo a cada dia dessa jornada.

Ao Prof. **JOSEPH PETER RUBIN**, Professor Titular do Departamento de Cirurgia Plástica da Universidade de Pittsburgh, pela precisa orientação, pela pronta resposta a todas as demandas, pelo exemplo da execução da pesquisa translacional em sua essência e pela inspiração a enxergar os problemas científicos além do óbvio.

Ao Prof. **ALBERT DONNENBERG**, Professor do Departamento de Medicina da Universidade de Pittsburgh, por auxiliar o delineamento dos experimentos e a análise estatística dos resultados, por me permitir um contato direto e encantador com a pesquisa básica e por perseguir persistentemente os meus objetivos ao meu lado.

À Prof^a. **VERA DONNENBERG**, Professora Associada do Departamento de Cirurgia Cardiorácica da Universidade de Pittsburgh, por partilhar comigo seu precioso tempo, idealizar e acompanhar a execução os experimentos, servir de exemplo como pesquisadora determinada e ávida, e acolher-me em seu laboratório e em sua vida com carinho e respeito.

À Prof^a. **LAUREN KOKAI**, Professora Assistente em Pesquisa do Departamento de Cirurgia Plástica da Universidade de Pittsburgh, pelo auxílio no planejamento e execução desse projeto, e pela disponibilidade em todas as ocasiões.

À Prof^a. **KACEY MARRA**, Professora Associada do Departamento de Cirurgia Plástica da Universidade de Pittsburgh, pelo auxílio na obtenção de recursos financeiros e na execução desse projeto.

Ao Prof. **JEFFREY FINE**, Professor Assistente do Departamento de Patologia da Universidade de Pittsburgh, por realizar a análise histológica.

A RYAN SCROTH, ISAAC JAMES, EMMANUELLE HAVIS, SHERI WANG, SU FU, AURORA ALMADORI, KASSANDRA ALBRIGHT, ARTA KELMEDI-DOKO, GABRIELA DI BERNARDO, CHRIS MAHONEY, DEBRA BOURNE, DAMIAN GRYBOWSKI, MATTHIAS WALDNER, JACI BLILEY, ERICA MORAVICKOVA, NOAH DONNENBERG e NATALIA KOSTEREVA, colegas de laboratório do *Adipose Stem Cell Center* e do *Hillman Cancer Center* da Universidade de Pittsburgh, pelo apoio e amizade nessa jornada.

Ao **MIKE MEYERS, ANTHONY GREEN** e à **LISA BAILEY**, técnicos de laboratório do *Adipose Stem Cell Center* e do *Hillman Cancer Center* da Universidade de Pittsburgh, por partilharem comigo seus conhecimentos durante o treinamento técnico, pela paciência e pelo carinho.

Aos Drs. e Dras. **ALICE TEIXEIRA LEITE, VANESSA CONTATO LOPES RESENDE, NATÁLIA DE LIMA E SILVA, FERNANDA ABIBI, PAULO AFONSO GUIMARÃES e FERNANDO AMATO**, colegas do grupo de Cirurgia da Mama da Disciplina de Cirurgia Plástica do Departamento de Cirurgia da Universidade Federal de São Paulo, por acompanharem esse projeto desde os primeiros passos e darem apoio a todas as suas etapas.

Aos professores do programa de pós-graduação em Cirurgia Translacional (UNIFESP-EPM), por serem exemplos constantes de pesquisadores honestos e determinados, pelas dúvidas solucionadas, pelos questionamentos e sugestões enriquecedoras.

À Prof^a. **GIANNI MARA SILVA DOS SANTOS**, Professora da Disciplina de Bioestatística da Universidade Federal de São Paulo, pelo auxílio na realização de parte da análise estatística.

À **SANDRA DA SILVA, MARTA REJANE e SILVANA APARECIDA DE ASSIS**, secretárias da Disciplina de Cirurgia Plástica do Departamento de Cirurgia da Universidade Federal de São Paulo, pelo auxílio constante, pelo carinho e pelo incentivo desde a época da residência médica.

Aos colegas do Programa de Pós-graduação em Cirurgia Translacional (UNIFESP-EPM), pelas múltiplas contribuições a cada dia de nossa amistosa convivência.

“If you do surgery, you touch one patient at a time; if you do science and create cloneable technology, you touch billions of patients at a time.”

(Peter C. Johnson)

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA.....	IV
AGRADECIMENTOS.....	V
LISTAS	XI
RESUMO	XV
<i>ABSTRACT</i>	XVI
1 INTRODUÇÃO	93
2 OBJETIVO	07
3 LITERATURA	09
4 MÉTODO	58
5 RESULTADOS.....	77
6 DISCUSSÃO.....	93
7 CONCLUSÃO	129
8 REFERÊNCIAS	131
NORMAS ADOTADAS	142
APÊNDICES.....	144
FONTES CONSULTADAS	154

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Proliferação de células MCF7 carregadoras e ativas em 10 dias.	63
Figura 2 - Lógica de distribuição das células ativas MCF7 em placas de poços para o xenoenxerto.	65
Figura 3 - Esquema ilustrativo de injeção em glândulas mamárias das camundongo-fêmeas.	66
Figura 4 - Procedimento de xenoenxerto de células MCF7 em glândulas mamárias das camundongos-fêmea.	67
Figura 5 - Procedimento de lipoenxertia em glândulas mamárias das camundongos-fêmea.	71
Figura 6 - Análise de sobrevida de Kaplan-Meier para surgimento de tumores em sítios submetidos ao xenoenxerto.	79
Figura 7 - Análise de sobrevida de Kaplan-Meier para surgimento de tumores maiores que 1 mm em sítios submetidos ao xenoenxerto.	80
Figura 8 - Análise de sobrevida de Kaplan-Meier para surgimento de tumores maiores que 5 mm em sítios submetidos ao xenoenxerto.	81
Figura 9 - Aspecto macroscópico <i>in situ</i> dos tumores obtidos por meio dos xenoenxertos.	82
Figura 10 - Representação da média de volumes tumorais em centímetros cúbicos medidos por picnômetro.	83

Figura 11 - Representação da média de massas tumorais em gramas medidas por balança de alta precisão.....	84
Figura 12 - Amostras de tumores corados em hematoxilina e eosina para determinação do grau histológico.....	85
Figura 13 - Distribuição percentual de tumores dos grupos Salina e Lipo conforme o grau histológico.....	86
Figura 14 - Amostras de tumores submetidos a método de imuno-histoquímica para detecção de ki67.....	87
Figura 15 - Representação da média de porcentagem de células positivas para ki67.....	88
Figura 16 - Imagem de tumor do grupo Salina corado em hematoxilina e eosina demonstrando invasão do tecido muscular adjacente.	89
Figura 17 - Exame macroscópico e microscópico de fígado, baço e pulmões para detecção de metástases à distância.	90
Figura 18 - Aspecto macroscópico <i>in situ</i> e após dissecação dos enxertos de gordura adjacentes aos tumores nas glândulas mamárias de camundongo-fêmea do grupo Lipo ao final do seguimento em 8 semanas.....	91
Figura 19 - Aspecto microscópico dos enxertos gordurosos.	92

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ASC	<i>Adipose Stem Cell</i> (célula-tronco do tecido adiposo)
ASPS	<i>American Society of Plastic Surgery</i> (Sociedade Americana de Cirurgia Plástica)
ASPRS	<i>American Society of Plastic and Reconstructive Surgery</i> (Sociedade Americana de Cirurgia Plástica e Reparadora)
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BIRADS	<i>Breast Imaging Reporting and Data System</i> (Sistema de informação e relato de imagem da mama)
°C	graus Celsius
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cm	centímetro
cm²	centímetro quadrado
cm³	centímetro cúbico
DAPI	4',6- diamidino-2-fenilindol
DMEM	meio de cultura de Eagle modificado por Dulbecco
EUA	Estados Unidos da América
FSC	<i>forward scatter</i>
g	gramas
g	gravidade
G	gauge
HE	hematoxilina eosina
HER 2	<i>Human Epidermal growth factor Receptor 2</i> (receptor do fator de crescimento epidérmico humano 2)
HGF	<i>Hepatocyte Growth factor</i> (fator de crescimento de hepatócito)
HGFR	<i>Hepatocyte Growth factor receptor</i> (receptor do fator de crescimento de hepatócito)
IFN	interferon
IL	interleucina
kg	quilograma
m²	metro quadrado

MCF	<i>Michigan Cancer Foundation</i> (Fundação do Câncer de Michigan)
ml	mililitro
mM	milimol
mm	milímetro
MSC	<i>mesenchymal stem cell</i> (célula-tronco mesenquimal)
μl	microlitro
μg	micrograma
NIH	<i>National Institute of Health</i> (Instituto Nacional de Saúde)
nm	nanômetro
PDGF	<i>Platelet-derived growth factor</i> (fator de crescimento derivado de plaquetas)
PLA	lipoaspirado processado
QT	quimioterapia
®	marca registrada
rpm	rotações por minuto
SDF 1	<i>Stromal cell derived factor 1</i> (fator derivado de células estromais 1)
SOFCPRE	<i>Société Française de Chirurgie Plastique Reconstructrice et Esthétique</i> (Sociedade Francesa de Cirurgia Plástica Reconstitutiva e Estética)
SSC	<i>Side scatter</i>
TGF beta	<i>Transforming growth factor beta</i> (fator transformador de crescimento beta)
TNF	<i>Tumoral necrosis factor</i> (fator de necrose tumoral)
U	unidade

RESUMO

Introdução: O enxerto de gordura vem sendo amplamente usado na reconstrução de mama sem evidência clínica de risco oncológico. Entretanto, as células-tronco do tecido adiposo vêm demonstrando em vários estudos *in vitro* e *in vivo* capacidade de promover crescimento e disseminação tumoral do câncer de mama. **Objetivo:** Avaliar o impacto da lipoenxertia sobre características macroscópicas e microscópicas de tumores em modelo experimental de neoplasia mamária residual em camundongos. **Método:** 40 camundongos-fêmea NOD-SCID gamma receberam xenoenxerto de 1000 células MCF7 em quatro sítios de glândulas mamárias. Após duas semanas, lipoaspirado humano preparado conforme técnica de Coleman (n=20, grupo lipo) ou solução salina estéril (N=20, grupo salina) foram injetados nos sítios tumorais. Em oito semanas, os tumores foram avaliados quanto a volume, massa, grau histológico, índice de Ki67 e ocorrência de metástases em fígado, pulmão e baço. **Resultados:** Todos os sítios enxertados com células neoplásicas formaram tumores e todos os enxertos de gordura integraram e foram detectados adjacentes aos tumores ao final do seguimento. Tumores de animais do grupo lipo apresentaram significativamente menor volume (p=0,046), menor massa (p=0,038) e menor proliferação medida pelo índice de Ki67 (p=0,01) que os do grupo salina. O índice histológico foi o mesmo em ambos os grupos e não foram detectadas metástases nos órgãos analisados. **Conclusão:** A lipoenxertia num modelo animal de tumor residual em camundongos não promoveu impacto negativo nas características macroscópicas e microscópicas do câncer de mama.

ABSTRACT

Introduction: Autologous fat grafting is becoming widely used for breast reconstruction with no evidence of increased oncologic risk. However, the bioactive adipose stromal cells have been shown in many *in vitro* and animal studies to promote cancer cell growth and dissemination. **Objective:** Assess the impact of fat grafting on macroscopic and microscopic features of tumors in a clinically relevant animal model of residual breast cancer. **Methods:** 40 female NOD-SCID gamma mice were injected with 1K MCF7 breast cancer cells in four sites of mammary fat pads. After tumor engraftment in two weeks, injections of human lipoaspirate prepared according to Coleman's technique (N=20, lipo group) or sterile saline (N=20, saline group) were performed at tumor sites. In eight weeks, tumors were assessed for volume, mass, histological grade, Ki67 positivity index and metastatic spread. **Results:** All sites injected with breast cancer cells formed macroscopic tumors and all fat grafts were retained and collocated with breast cancer at the end of follow-up. Tumors from animals in the lipo group presented significantly lower volume ($p=0.046$), lower mass ($p=0.038$) and lower Ki67 proliferation index assessed by Ki67 positivity ($p=0.01$) compared to the saline group. Histological grade was the same for both groups and no metastatic lesion was identified in lung, liver or spleen of any animal. **Conclusion:** Fat grafting performed in the setting of residual breast tumor in an animal model did not cause any worsening in macroscopic or microscopic features of breast cancer.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

O câncer de mama invasivo afeta uma em cada oito mulheres americanas ao longo da vida. Tanto nos Estados Unidos da América (EUA) quanto no Brasil, trata-se da neoplasia maligna mais frequentemente diagnosticada na população feminina, excluindo-se as neoplasias cutâneas não melanoma, somando entre as americanas 30% de todos os diagnósticos de câncer e entre as brasileiras, 28% (SIEGEL *et al.*, 2017; INCA, 2017).

O manejo de repercussões psicossociais do tratamento do câncer de mama é considerado uma das prioridades na assistência às sobreviventes (RUNOWICZ *et al.*, 2016). Nesse contexto, a reconstrução de mama constitui parte indispensável do tratamento das pacientes portadoras de neoplasia mamária.

Além de demonstrar não interferir negativamente no tratamento oncológico das pacientes, a reconstrução acarreta efeitos positivos na melhora da qualidade de vida, satisfação com a aparência, nível de atividade física, função sexual e psicossocial (VEIGA *et al.*, 2004; KOKUBA *et al.*, 2008; ELTAHIR *et al.*, 2013; NETO *et al.*, 2013; YANG *et al.*, 2015; PINELL-WHITE *et al.*, 2015a; AGUIAR *et al.*, 2017).

A reconstrução de mama possui duas modalidades básicas: a autóloga e a baseada em implantes. A reconstrução autóloga, que emprega tecidos da própria paciente classicamente por meio da confecção de retalhos, tem sido considerada superior à reconstrução com implantes em termos de resultados em longo prazo e da satisfação das pacientes (ELTAHIR *et al.*, 2015; WEICHMAN *et al.*, 2015). No entanto, requer um tempo de recuperação mais longo e um maior número de procedimentos de refinamento, além de

gerar morbidade na área doadora. A reconstrução baseada em implantes, por sua vez, permite uma recuperação mais rápida e sem morbidade de áreas doadoras. Entretanto, apresenta diversas complicações a curto e longo prazo como mau posicionamento de implantes, infecção, contratura capsular, ruptura do implante, podendo requerer remoção com ou sem substituição do implante e reintervenção cirúrgica (FDA, 2011).

O enxerto de gordura é uma opção efetiva de reconstrução de mama autóloga, pouco invasiva e de baixa morbidade. Pode ser aplicado a pacientes mastectomizadas, submetidas à cirurgia conservadora no tratamento do câncer de mama, e até mesmo no tratamento da radiodermite pós-radioterapia (AMAR *et al.*, 2008, DELAY *et al.*, 2008, RIGOTTI *et al.*, 2007). As vantagens da gordura na restituição volumétrica de tecidos moles são inúmeras: total biocompatibilidade, ampla disponibilidade, baixo custo, estabilidade, potencial de longa permanência, possibilidade de remoção, facilidade de coleta e processo de integração natural ao sítio enxertado (COLEMAN, 2006).

Ainda na década de 1980, a *American Society of Plastic Surgery* (ASPS) emitiu uma avaliação sobre o enxerto de gordura em mamas, condenando de forma unânime o seu uso pelo possível prejuízo no rastreamento do câncer de mama por mamografia, devido à formação de calcificações na área enxertada, podendo confundir clínicos e radiologistas quanto à presença de lesões malignas ou benignas (KLING *et al.*, 2013).

No entanto, as recomendações atuais, a respeito do uso de lipoenxertia na mama, tornaram-se mais moderadas. Em 2009, a ASPS manifestou-se novamente e atestou a incapacidade de realizar recomendações formais para o uso da lipoenxertia, pela falta de estudos adequados. No entanto, não apresentou contraindicações ao procedimento, mas apenas recomendou

cautela na seleção de pacientes com maior risco intrínseco de recidiva, como as portadoras de história familiar positiva ou mutações genéticas (GUTOWSKI, 2009). O último relatório da ASPS acerca do enxerto de gordura em mamas após mastectomia, publicado em 2015, indicou que o procedimento apresentava ótimo resultado estético; frequente necessidade de ser realizado em múltiplas sessões; baixo índice de complicações, podendo este ser elevado pelo uso prévio de radioterapia; e incapacidade de interferir no diagnóstico precoce do câncer de mama ou de aumentar o risco de recorrência, sendo, portanto, considerado seguro e efetivo nesse grupo de pacientes (ASPS, 2015).

O tecido adiposo, no entanto, não se trata de um preenchedor inerte. Nas últimas décadas, foi reconhecido como uma rica fonte de células-tronco multipotentes (ZUK *et al.*, 2002) e de células residentes do sistema imunológico (SILVA *et al.*, 2016). Além da capacidade de reestabelecer o volume nas reconstruções de partes moles e, em especial, na reconstrução de mama, a gordura pode ter efeitos angiogênicos, melhorar viabilidade de retalhos e ser capaz de orquestrar uma resposta de cicatrização de feridas por meio, principalmente da ação das células-tronco do tecido adiposo (SUARTZ *et al.*, 2014, GIMBLE *et al.*, 2016). A gordura é muito ativa quanto ao potencial secretório, podendo produzir e liberar diversos fatores de crescimento e citocinas (KAPUR & KATZ, 2013, SCHAFFLER, SCHOLMERIC & BUECHLER, 2007), mantendo tais características, mesmo após criopreservação (ZANATA *et al.*, 2016). Isso rende ao tecido adiposo um enorme potencial de interações autócrinas, Parácrinas e endócrinas. Nesse potencial, residem ao mesmo tempo as melhores expectativas e os maiores receios quanto ao enxerto de gordura em mamas.

Os estudos experimentais sobre a interação entre células do câncer de mama e células-tronco do tecido adiposo (ASCs), em sua maioria, demonstram o favorecimento da proliferação e da disseminação tumoral. Uma revisão publicada por SCHWEIZER *et al.*, em 2015, reuniu 26 estudos, incluindo experimentos *in vitro* e *in vivo* e a quase totalidade deles apontava para um aumento do crescimento tumoral, do potencial metastático, da transição epitelial-mesenquimal e da angiogênese. Experimentos com ASCs humanas e linhagens celulares de neoplasia mamária demonstram que as ASCs migram em direção a sítios tumorais e podem realizar a transcrição de fatores pró e antitumorigênicos (SENST *et al.*, 2013).

Os primeiros estudos clínicos sobre esse tópico consistiram em séries de casos. Avaliaram o resultado estético e a satisfação das pacientes após enxertia gordurosa nas mamas com resultados favoráveis (ILLOUZ & STERODIMAS, 2009). Como refinamento em procedimentos da reconstrução pós-mastectomia ou nas reconstruções de cirurgia conservadora da mama, não apontaram aumento de recidiva do câncer após enxerto de gordura, além de sugerir que se trata de procedimento de baixo índice de complicações, e não interfere no seguimento radiológico das pacientes (PETIT *et al.*, 2011, RIETJENS *et al.*, 2011, IHRAI *et al.*, 2013, KAOUTZANIS *et al.*, 2016). Em pacientes tratados com cirurgia conservadora da mama não foi evidenciado aumento de recidiva da neoplasia, após reconstrução com enxertia gordurosa (BRENELLI *et al.*, 2014).

Em seguida, foram realizados estudos do tipo coorte retrospectiva com controles pareados, nos quais não houve evidência de relação entre o enxerto de gordura nas mamas e a recidiva da neoplasia mamária (PETIT *et al.*, 2012, GALE *et al.*, 2015, KRONOWITZ *et al.*, 2016). Apenas em um estudo

realizado em pacientes com neoplasias intraepiteliais o enxerto de gordura foi associado a um maior índice de recidiva, que não se manteve em seguimento em longo prazo (PETIT *et al.*, 2013, PETIT *et al.*, 2017).

Portanto, os estudos clínicos não fornecem substrato em suas conclusões para determinar condutas clínicas. Todavia, as publicações têm sido muito consistentes e concordantes em apontar a inexistência de associação da enxertia gordurosa nas mamas com a recidiva local ou sistêmica da neoplasia.

A clara dissociação entre resultados de estudos pré-clínicos e clínicos, quanto à repercussão da enxertia gordurosa em mamas com neoplasia maligna, é um impedimento crítico para a elaboração de conclusões sólidas, capazes de embasar diretrizes para cirurgiões plásticos, mastologistas e oncologistas. A realização de coortes prospectivas e de novos estudos com modelos experimentais, que se aproximem do cenário clínico, faz-se imprescindível para o esclarecimento da segurança oncológica do enxerto de gordura nas mamas de pacientes portadoras da neoplasia mamária.

OBJETIVO

2. OBJETIVO

Avaliar o impacto da lipoenxertia sobre características macroscópicas e microscópicas de tumores em modelo experimental de neoplasia mamária residual em camundongos.

LITERATURA

3. LITERATURA

3.1. Lipoenxertia na Cirurgia Plástica geral e a descoberta de seu potencial regenerativo

NEUBER (1893) descreveu o primeiro caso do uso de enxerto de gordura na Cirurgia Plástica reparadora. Utilizou pequenos fragmentos de gordura do membro superior para reparar defeito volumétrico cônico, decorrente de depressão cicatricial na região infraorbitária de um indivíduo masculino de 20 anos, causado por osteíte tuberculosa na infância. O procedimento teve bom resultado estético e não apresentou complicações.

CZERNY (1895) publicou o caso da primeira reconstrução de mama com gordura. Uma paciente de 41 anos, portadora de mastite intersticial com suspeita de evolução para adenofibroma, foi indicada a submeter-se à mastectomia. Por tratar-se de paciente com mamas hipertróficas, uma notável assimetria adviria desse procedimento cirúrgico. Um volumoso lipoma, localizado no flanco direito, foi transplantado com cápsula íntegra para a mama como procedimento de reconstrução. A mama enxertada foi avaliada como levemente menor e mais escura que a contralateral, mas foi considerada com boa evolução.

PEER (1950) propôs-se a estudar em humanos a perda de volume e peso dos enxertos de gordura. Desejava resolver dúvidas cruciais acerca da lipoenxertia: mecanismo de integração da gordura autóloga e homóloga,

tamanho ideal, percentual de perda volumétrica, absorção e invasão por células hospedeiras, e vascularização. Demonstrou completa absorção de enxertos isógenos em um seguimento de seis meses. Enxertos autólogos de múltiplos fragmentos perderam mais massa (79%) do que os enxertos em bloco (45%). Análise histológica demonstrou degeneração inicial não centralizada da gordura enxertada, formação de cistos, vascularização crescente por inosculação e formação de cápsula. O autor propõe ainda uma estabilização volumétrica do enxerto após um ano, exceto em casos de grandes variações ponderais do receptor. Conclui com a “teoria da sobrevivência celular” e postula que uma célula adiposa componente do enxerto pode ter dois destinos: sobreviver e manter suas características, ou morrer e ser substituída por tecido fibroso.

ILLOUZ (1983) foi o pioneiro ao propor a lipoaspiração como método de correção de deformidades da lipodistrofia, sem grandes descolamentos ou ressecções cutâneas. 3447 pacientes foram submetidas à aspiração com cânula romba, de ponta redonda e com orifícios voltados para o subcutâneo a uma profundidade de um centímetro (cm) da pele em diversas topografias: flancos, culotes, abdome, tornozelo, submento, face interna dos joelhos e braços. O limite de aspiração foi definido em seis libras. O autor considerou os resultados bons por meio de critérios próprios, e sem considerar o ponto de vista das pacientes. Nenhum tipo de complicação foi citado.

COLEMAN (1995) publicou uma série de casos de lipoenxertia com seguimento de até seis anos. Na metodologia, detalhou a técnica de Coleman para obtenção e preparo do enxerto de gordura, que consiste na aspiração com cânula romba de três milímetros (mm) de diâmetro conectada à seringa de 10 mililitros (ml) com baixa pressão negativa, para reduzir o trauma ao

tecido adiposo; seguida de preparo por centrifugação, durante três minutos a 3000 rotações por minuto (rpm), para separar os componentes do lipoaspirado entre adiposos, aquosos e oleosos; e, por fim, a enxertia em múltiplos túneis por meio de cânula romba em contato próximo a tecidos bem vascularizados.

ZUK *et al.* (2001) buscavam uma fonte de obtenção de células-tronco para aplicações em medicina regenerativa com melhor rendimento e menor morbidade na coleta que a medula óssea. Descobriram em seu estudo que, a partir da lipoaspiração, era possível obter uma população celular semelhante a fibroblastos, que chamaram de lipoaspirado processado (PLA). O processamento da gordura para obtenção de PLA foi feito por meio de lavagem, digestão enzimática da matriz extracelular com colagenase, centrifugação e lise de hemácias, obtendo-se um botão celular da fração estromal vascular. As células componentes do botão foram submetidas à cultura em frasco plástico. A fração celular que aderiu ao plástico foi chamada inicialmente de lipoaspirado processado e, logo mais, de células-tronco derivadas do tecido adiposo (ASCs). Tais células demonstraram perfil de marcadores de superfície de linhagem mesodérmica e capacidade de manutenção estável e duplicação *in vitro* por períodos longos, sem evoluir para senescência. Apresentaram potencial de diferenciação, quando estimuladas por meio de cultura específica, em adipócitos, condrócitos, osteócitos e miócitos. Consideraram essas células multipotentes possíveis alternativas ao uso de células-tronco da medula óssea.

ZUK *et al.* (2002) prosseguiram com o estudo da caracterização das células do PLA e de seus clones e a comparação às células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea. Ambas as populações

apresentaram marcadores de superfícies de células-tronco mesenquimais, com pequenas diferenças quanto à expressão de *cluster of differentiation* (CDs) 49d e 106, o que confirma tratarem-se de diferentes populações de células-tronco mesenquimais. A diferenciação das ASCs em linhagens adipogênica, osteogênica, condrogênica, miogênica e neurogênica teve comprovação não apenas morfológica, mas também por expressão gênica e síntese protéica, com diferenças leves em relação aos seus pares medulares. Não apenas as ASCs isoladas, mas os seus clones mantiveram a capacidade de pluridiferenciação. São considerados achados muito promissores a multipotencialidade e a plasticidade dos clones das ASCs como uma nova fonte de recurso para a medicina regenerativa.

KOKAI *et al.* (2016) produziram um estudo sobre a manutenção da função das ASCs com o avanço da idade. A perspectiva de utilizar ASCs para terapias regenerativas levou vários pacientes a optar por manter as suas células em bancos celulares. No entanto, não há definição de uma idade ideal para a coleta celular. Foram comparadas as taxas de recuperação celular, a viabilidade e a composição celular de frações estromais vasculares e a capacidade de proliferação e diferenciação das ASCs de três indivíduos coletadas com intervalos de tempo de 7 a 12 anos a partir do mesmo indivíduo. A subpopulação de ASCs representou até 2% das células recuperadas a partir da gordura. Não foram evidenciadas diferenças estatisticamente significantes entre composição ou taxa de recuperação celular, capacidade proliferativa ou de tridiferenciação.

3.2. Estudos clínicos sobre lipoenxertia na reconstrução de mama

RIETJENS *et al.* (2011) publicaram uma série de 158 casos de pacientes submetidas à lipoenxertia segundo a técnica de Coleman (1995) para reconstrução mamária, das quais 98% possuíam câncer de mama. Descreveram complicações imediatas pouco mórbidas como liponecrose e infecção local em até 3,6% casos. Demonstraram pequena incidência (5,9%) de alterações mamográficas em seguimento pós-operatório de seis meses, sendo todas elas sugestivas de benignidade. Defenderam o enxerto de gordura como modalidade factível e pouco mórbida na reconstrução de mama, mas destacaram a necessidade de mais estudos quanto à retenção do volume enxertado e ao risco potencial de ativação de células tumorais “adormecidas” na promoção da recorrência local.

PETIT *et al.* (2011) fizeram uma série de casos em 3 serviços distintos de cirurgia plástica europeus e reuniram 646 pacientes com o critério de inclusão abrangente de ter sido submetida a enxerto de gordura nas mamas após tratamento cirúrgico de neoplasia mamária, sem distinção de subgrupos por variáveis oncológicas ou grupo controle sem lipoenxertia. As taxas de recidiva loco-regional total de 2,4% e de 1,5% ao ano foram condizentes com achados de estudos semelhantes prévios. Foram avaliadas ainda alterações radiológicas pós-enxerto de gordura, que ocorreram em 10,1% das pacientes avaliadas e resultaram em apenas dois casos de recidiva (16,6% das pacientes com alterações radiológicas). As complicações ocorreram em 2,8% dos casos, sendo a liponecrose isolada responsável por 2%. Devido ao delineamento do estudo, as conclusões possíveis foram apenas a baixa taxa de complicações associada ao procedimento e a incapacidade de o enxerto

de gordura interferir no seguimento radiológico pós-operatório das pacientes portadoras de neoplasia mamária.

PARIKH *et al.* (2012) estudaram retrospectivamente prontuários de 286 pacientes submetidas a reconstrução de mama com lipoenxertia como refinamento de contorno em procedimento secundário. 37 pacientes apresentaram 66 massas palpáveis nas mamas e foram submetidas a exame de imagem. Os exames foram avaliados por um radiologista “cego” e classificadas conforme a escala *Breast Imaging Reporting and Data System (BIRADS)* para ultrassonografia em cinco categorias diferentes, sendo apenas uma suspeita de malignidade. Apenas uma das 66 lesões estudadas era maligna, mas havia se desenvolvido em sítio distante da lipoenxertia. Todas as demais lesões, incluindo 85,7% das lesões suspeitas de malignidade eram, na verdade, esteatonecroses. Um total de 29 dessas lesões foram submetidas à ultrassonografia de controle em seis meses e não revelaram nenhuma alteração em tamanho ou vascularização. Propõe-se que a ultrassonografia pode ser um método confiável para diferenciar lesões palpáveis entre necrose gordurosa e recorrência tumoral, no entanto, estudos prospectivos são necessários para confirmar a reprodutibilidade e validade desse método.

RUBIN *et al.* (2012) realizaram um estudo comparando alterações radiográficas em mamas após lipoenxertia enriquecida com fração estromal para aumento primário numa população de 27 mulheres japonesas e após mamoplastia redutora de pedículo medial ou ínfero-medial em 23 mulheres americanas. Exames mamográficos realizados para seguimento pós-operatório em um ano foram avaliados por oito radiologistas diferentes e “cegos”. Cicatrizes, calcificações benignas e massas requerendo biópsia

foram significativamente menos comuns no grupo da lipoenxertia assim como a pontuação na Escala de BIRADS. Diante dos resultados, os autores advogaram pela segurança do enxerto de gordura nas mamas, no que diz respeito ao rastreamento do câncer de mama. Defenderam que as alterações mamográficas produzidas por esse procedimento não foram maiores do que as provocadas pela mamoplastia redutora, cirurgia consagrada e não considerada potencial prejuízo ao rastreamento da neoplasia mamária.

PÉREZ-CANO *et al.* (2012) desenvolveram um ensaio clínico prospectivo, multicêntrico e não randomizado para avaliar o uso de enxerto de gordura enriquecidos com células estromais derivadas do tecido adiposo. Foram recrutadas 67 pacientes (68 mamas) em quatro países e submetidas ao enxerto de gordura para reconstrução de defeitos volumétricos após cirurgia conservadora para tratamento do câncer de mama. Os focos principais do estudo eram satisfação de pacientes e cirurgiões com o resultado estético, melhora de sintomas e sinais de radiodermite (61 pacientes tinham sido submetidas à radioterapia), correção de deformidades volumétricas avaliadas por ressonância magnética. A satisfação foi relatada como alta tanto por pacientes como pelos cirurgiões. A radiodermite não apresentou melhoras significativas, mas isso pode ter sido devido à exclusão de pacientes com casos mais avançados, o que reduz o potencial de aferição de mudanças. As imagens de ressonância magnética apresentaram bastante dificuldade de revelar mudanças volumétricas nas mamas, levando a uma discrepância entre as imagens e os resultados clinicamente observados e sugerindo que outros métodos de imagem em três dimensões deveriam ser empregados nessa avaliação com maior potencial de correlação clínica. Também foi evidenciado que nenhuma das pacientes apresentou recorrência tumoral local, após o procedimento de lipoenxertia, enriquecida com células

estromais, derivadas do tecido adiposo em seguimento de um ano. Embora o período seja curto, esse dado foi apresentado pelos autores como promissor e fomentador da necessidade de novas investigações.

PETIT *et al.* (2012) publicaram uma série de 963 pacientes do Instituto Europeu de Oncologia, cujos prontuários foram avaliados retrospectivamente, sendo 321 pacientes submetidas à lipoenxertia e 642 controles pareados. O pareamento dos grupos foi feito quanto à idade, tipo e tempo da cirurgia primária para tratamento do câncer de mama, tipo e grau histológico do tumor e status dos receptores estrogênicos. O seguimento médio foi de 56 meses desde o tratamento primário da neoplasia mamária e 26 meses a partir de uma linha de base, que seria a data do enxerto de gordura para o grupo estudo e o mesmo tempo livre de recidiva decorrido desde a cirurgia primária no grupo controle. Não houve diferença na incidência cumulativa de eventos locais em ambos os grupos, independentemente da forma de tratamento primária do tumor, entre as quais a mastectomia foi mais comum (59%) que a cirurgia conservadora. Uma análise de subgrupo foi feita para pacientes com neoplasias intra-epiteliais, onde as pacientes submetidas ao enxerto gorduroso apresentaram níveis de recidiva tumoral local significativamente maiores. No entanto, tratava-se apenas de 37 pacientes e uma população heterogênea no que se refere a características tumorais, de modo que mais estudos precisariam esclarecer se trata-se apenas de um viés de seleção ou se tais resultados podem ser clinicamente relevantes. Uma consideração importante foi feita quanto ao fato de pacientes submetidas à lipoenxertia terem sido submetidas à avaliação clínica antes do procedimento de modo que foram excluídas por contraindicação cirúrgica aquelas que apresentassem alterações clínicas. Dessa forma, foi realizada uma análise específica considerando um período

de seis meses a partir da linha de base para ambos os grupos (período em que haveria maior risco de recidiva) e, ainda assim, nenhuma diferença de risco de recorrência foi detectada.

PETIT *et al.* (2013) publicaram um trabalho subsequente com enfoque específico em neoplasias intraepiteliais. Foram selecionadas 59 pacientes e, para cada uma delas, dois controles foram pareados quanto à idade, características do tumor (histologia lobular ou ductal e positividade para receptores estrogênicos) e tratamento (tipo e momento da cirurgia primária, status das margens de ressecção, radioterapia e uso de terapia hormonal). O seguimento médio foi de 63 meses para o grupo estudo e 66 meses, para o controle. A incidência cumulativa em cinco anos de recorrência foi 18% para pacientes que receberam enxerto de gordura e 3% para as que não receberam, sendo essa diferença estatisticamente significativa. O tempo de ocorrência das recidivas também foi mais curto para o grupo estudo (36 meses *versus* 56 meses). Uma análise de subgrupo exploratória foi realizada apontando para idade menor que 50 anos, quadrantectomia como tratamento primário, tempo entre tratamento do tumor e lipoenxertia, tumores de alto grau histológico e Ki67 maior ou igual a 14 como fatores de possível aumento de risco para recidiva após lipoenxertia. No entanto, devido ao pequeno número de pacientes incluídas nessa análise, ela não gerou conclusões sólidas e generalizáveis. Para justificar o risco aumentado de recorrência tumoral nesse grupo de pacientes, foi aventada a hipótese de que neoplasias intraepiteliais, por acumularem menos alterações genéticas que as demais, podem ser mais suscetíveis à sinalização de estímulo proliferativo proveniente das células estromais derivadas do tecido adiposo.

KLING *et al.* (2013) enviaram um questionário por meio de correio eletrônico a 2584 membros da Sociedade Americana de Cirurgia Plástica com perguntas relacionadas à prevalência e aplicações da lipoenxertia na mama. Obtiveram resposta de 456 membros e 62% declararam fazer uso frequente do enxerto de gordura na reconstrução de mama, principalmente como terapia adjuvante ao uso de implantes ou retalhos, e 28%, na cirurgia estética da mama. 87% dos cirurgiões que indicaram regularmente o enxerto de gordura na reconstrução de mama, o fizeram, inclusive, na cirurgia conservadora para tratamento do câncer de mama. A coleta mais comumente utilizada era feita com cânulas a partir da gordura abdominal, e os modos de preparo mais usados eram filtração e centrifugação. Metade dos entrevistados julgava como obstáculo ao uso o enxerto de gordura a baixa previsibilidade de retenção e a possibilidade de interferir com o rastreamento do câncer; 49% apontaram a falta de evidência sobre o impacto da lipoenxertia no risco de surgimento ou recorrência da neoplasia mamária. Sugeriram a necessidade de padronização técnica do procedimento e a criação de um banco de dados clínicos nacional e prospectivo do uso da lipoenxertia em cirurgia estética e reconstrução de mama.

SKILLMAN *et al.* (2013) elaboraram um questionário sobre frequência do uso da lipoenxertia e familiaridade com a técnica. Enviaram-no por correio eletrônico e ofereceram em eventos científicos. Obtiveram um total de 228 respostas entre cirurgiões plásticos e mastologistas britânicos. 69% dos cirurgiões plásticos declararam fazer enxerto de gordura nas mamas regularmente. Cirurgiões mais jovens tenderam a utilizar essa técnica de forma mais frequente. Mais de 60% dos cirurgiões acreditavam que os benefícios da lipoenxertia superam os riscos, embora eles levantassem alguns pontos de ressalva como a falta de estudos prospectivos com

seguimento longo, a preocupação com o conteúdo de células-tronco na gordura enxertada, as alterações radiológicas decorrentes do procedimento, a necessidade de múltiplos procedimentos e a possível necessidade de biópsia em áreas de esteatonecrose. Concluíram estimulando a criação de um sistema de informações, incluindo dados sobre recorrência, seqüela radiológica e resultado cosmético nas pacientes.

IHRAI *et al.* (2013) descreveram uma série retrospectiva de casos franceses de 64 pacientes submetidas à reconstrução mamária tardia com lipoenxertia e seguidas por, em média, 124.7 meses, na qual apenas dois casos apresentaram recidiva tumoral. Particularmente, as duas pacientes que sofreram recidiva tinham, primariamente, tumores de estágio mais avançado, naturalmente com maior risco de recidiva, e receberam lipoenxertia 13.2 meses e 7.7 meses após a mastectomia. Comparado às demais séries de casos publicadas, o período entre tratamento primário do câncer e enxerto gorduroso foi mais curto, o que pode ter favorecido as recorrências em um território já mais propenso pelas características iniciais dos tumores. Sugeriram o uso de escores padronizados de risco de recidiva em cinco ou dez anos para auxiliar a individualização da indicação do enxerto de gordura.

BRENELLI *et al.* (2014) apresentaram uma série prospectiva de casos. 59 pacientes tratadas cirurgicamente para neoplasia mamária com cirurgia conservadora foram submetidas à reconstrução de mama com enxerto de gordura em média 76 meses após o tratamento oncológico. A maioria (69,3%) das pacientes apresentava estágios precoces de neoplasia mamária e 94,9% tinham sido submetidas à radioterapia adjuvante. Recidiva de 4% e risco de recidiva de 1,4% ao ano foram condizentes com a literatura

atual. E mais uma vez não se provou aumento da recidiva da neoplasia mamária após a realização de enxerto de gordura em mamas.

GALE *et al.* (2015) reproduziram com casuística britânica uma metodologia muito semelhante ao trabalho de Petit *et al.*, em 2012. Uma série de 211 casos foi analisada retrospectivamente e comparada a 422 controles pareados por idade, tempo decorrido entre a cirurgia e o tratamento do câncer, tipo de cirurgia, histologia tumoral, positividade para receptores estrogênicos e tempo livre de doença até o enxerto de gordura. Nenhuma associação significativa entre lipoenxertia e recorrência do câncer de mama foi observada. A subpopulação submetida a tratamento cirúrgico conservador da neoplasia mamária foi apenas 16.6% e, nesse grupo, a recorrência foi mais alta que nos seus controles pareados, mas não atingiu significância estatística. Foi ressaltada a importante questão de o tempo decorrido entre o tratamento do tumor e a lipoenxertia poder relacionar-se ao risco de recidiva, sendo esta maior quanto menor for aquele. Considerações quanto às bases moleculares desses achados foram discutidas, como o papel secretor angiogênico, antiapoptótico e imunomodulatório das células derivadas do tecido adiposo. Ainda foram feitas hipóteses de atividade imunológica e maior complexidade biológica para explicar a divergência entre resultados clínicos, apontando em direção à segurança da lipoenxertia como método de reconstrução da mama e a profusão de trabalhos experimentais *in vitro* e *in vivo*, apresentando maior proliferação e disseminação de células de neoplasia mamária em contato com células estromais do tecido adiposo.

PINELL-WHITE *et al.* (2015b) fizeram um estudo prospectivo de coorte com pacientes submetidas à reconstrução de mama com lipoenxertia e controles pareados por idade no momento da reconstrução, tempo decorrido desde a reconstrução e tipo de reconstrução (implantes ou tecido autólogo). Foram analisadas imagens do seguimento oncológico de até quatro anos de 51 mamas reconstruídas. Pacientes que receberam enxerto de gordura necessitaram de mais exames de imagem em seu seguimento e de maior número de biópsias, sem significância estatística. A incidência de achados anormais de imagem foi idêntica entre os grupos e foi encontrada uma baixa correlação entre a área desses achados e os sítios de lipoenxertia. Os autores sugeriram que mamas com enxerto de gordura sofreram um número maior de procedimentos cirúrgicos e essa frequência de reoperações, e não o enxerto de gordura em si, pode ser responsável pela maior incidência de alterações radiológicas.

KAOUTZANIS *et al.* (2016) relataram uma série de casos de pacientes americanas em Michigan, avaliando recorrência de neoplasia mamária especificamente no grupo que recebeu enxerto de gordura na sua indicação mais difundida: os refinamentos em reconstrução de mama. Pacientes submetidas à mastectomia e reconstrução autóloga ou baseada em implantes tiveram seus prontuários revisados de forma retrospectiva. 107 pacientes (167 mamas) foram seguidas, em média por 20,2 meses. 31,7% das pacientes (53/167 mamas) tiveram de ser submetidas à investigação diagnóstica da mama após a lipoenxertia. Dessas, 28 o fizeram por procedimento de vigilância próprio da instituição onde eram tratadas e 25 o fizeram por indicação clínica (lesão palpável, dor persistente, hipótese de ruptura capsular). Apenas oito necessitaram de biópsia após exame de imagem e em nenhum desses casos malignidade foi confirmada. Isso veio a

reforçar a hipótese de que o enxerto de gordura, em sua aplicação mais comum, não demonstrou estar associado a maior índice de recorrência.

KRONOWITZ *et al.* (2016) realizaram um estudo retrospectivo de controles pareados no *MD Anderson Cancer Center* (Texas, EUA) com a maior casuística até o momento (1024 casos e 670 controles pareados). Compararam pacientes submetidas à mastectomia e reconstrução, com ou sem enxerto de gordura, quanto à incidência de recidiva tumoral e avaliaram ainda um grupo de pacientes que se submeteram à mastectomia redutora de risco e lipoenxertia, quanto ao risco de desenvolverem tumores primários da mama. Apesar das heterogeneidades dos grupos controle e caso quanto a idade, estágio da neoplasia, positividade para HER2-neu (*Human Epidermal growth factor Receptor 2*, receptor do fator de crescimento epidérmico humano 2), uso de quimioterapia e hormonioterapia, os autores defenderam que as diferenças convergiram de modo a não comprometer a comparabilidade dos grupos. De um modo geral, diferenças em recorrência local ou sistêmica não foram encontradas. Em se tratando de recorrência local, evidenciou-se numa análise de subgrupo um aumento de risco nas pacientes em uso de hormonioterapia e cujas mamas foram reconstruídas com lipoenxertia. Nenhuma paciente no grupo de mastectomia redutora de risco evoluiu com neoplasia mamária num seguimento de 33,6 meses, mesmo no subgrupo com genes BRCA positivos. As diferenças entre os grupos controle e caso e o delineamento retrospectivo do estudo mantiveram as suas contribuições relevantes, porém dignas de ressalvas e ainda insuficientes para determinação de conduta terapêutica. Seus autores, no entanto, concluíram, com uma visão otimista que, até a definição dos reais riscos da lipoenxertia, não reconheciam motivos para o abandono ou a restrição dessa modalidade na reconstrução de mama.

PETIT *et al.* (2017) avaliaram pacientes que receberam tratamento cirúrgico conservador para o câncer de mama e enxerto de gordura como modalidade de reconstrução. Num estudo de caso-controle, recrutaram um total de 644 pacientes com neoplasia mamária (322 controles e 322 casos), pareadas quanto à idade, tamanho do tumor, número de linfonodos acometidos, *status* do receptor de estrogênio, índice proliferativo de Ki67, status de superexpressão de HER-2, uso de quimioterapia neoadjuvante e tipo de radioterapia adjuvante. O tempo médio de seguimento foi de 4,8 anos para casos e 4,4 para controles. Não foram observadas diferenças no desenvolvimento de recorrência ipsilateral, metástases linfonodais ou à distância, câncer de mama contralateral, novo tumor primário da mama ou mortalidade. Neste estudo, mencionaram ainda dados não publicados de uma análise estatística com maior tempo de seguimento da coorte publicada em 2013 com pacientes portadoras de neoplasia intraepitelial. No seguimento mais longo, não foi possível comprovar o aumento de recorrência em pacientes submetidas à lipoenxertia.

3.3. Revisões e regulamentação da lipoenxertia em mamas

A *American Society of Plastic and Reconstructive Surgery - ASPRS* (1987) emitiu comunicado oficial, com base nos estudos disponíveis até o momento, contraindicando o uso de enxerto de gordura autólogo no aumento mamário. Justificavam que a integração do enxerto era baixa e a resposta do tecido não integrado era formação de fibrose e calcificação. Como resultado, acreditava-se que isso dificultaria o exame clínico e, principalmente, a detecção do câncer de mama por meio da mamografia.

GUTOWSKI (2009) relatou o resultado de uma força-tarefa criada pela *American Society of Plastic Surgeons* dedicada a elaborar uma revisão baseada em evidências sobre a eficácia e a segurança do enxerto de gordura nas mamas, e fornecer recomendações práticas. A busca de literatura foi feita nas bases *PubMed* e *Cochrane*, apenas em língua inglesa e francesa, e estudos em humanos, resultando em 110 artigos. As recomendações foram: a lipoenxertia poderia ser indicada para mamoplastia de aumento e reconstrução de mama, no entanto, os resultados eram dependentes da técnica e da experiência do cirurgião; a lipoenxertia mamária poderia ser considerada um método seguro, porém as pacientes deveriam ser esclarecidas sobre possíveis complicações, sendo a infecção a principal delas, e assinar termo de consentimento; na determinação da paciente candidata à lipoenxertia nas mamas, o cirurgião deveria ser cauteloso com as que possuem antecedentes pessoais ou familiares de neoplasia mamária ou mutações gênicas de alto risco para câncer de mama; no pré-operatório da lipoenxertia, deveria ser solicitada mamografia. Ressalvas foram feitas acerca do pequeno número de estudos e da baixa qualidade metodológica deles, impedindo recomendações específicas e de alto nível de evidência em diversos tópicos.

LOHSIRIWAT *et al.* (2011) publicaram uma revisão narrativa sobre o papel do enxerto de gordura nas pacientes com câncer de mama. Reconhecido como uma ferramenta importante e de uso comum no arsenal da reconstrução mamária, o enxerto gorduroso não apenas restabelece volume, mas também é capaz de melhorar cicatrizes e danos da radiodermite. A interação da gordura enxertada com as células tumorais parece dar-se muito mais por meio da composição estromal e extracelular do tumor do que por uma ação célula-célula. O tecido adiposo é capaz de secretar diversas

adipocinas, fatores com ação endócrina, parácrina e autócrina. Dentre as principais adipocinas, destacam-se a leptina e a adiponectina. A primeira parece ter relação independente com a carcinogênese mamária e está aumentada em pacientes com outros tipos de neoplasia também (pulmão, estômago, cólon, rim, tumores epiteliais e leucemias). A adiponectina, por outro lado, parece estar reduzida em pacientes com neoplasia mamária e pode reduzir a proliferação e viabilidade de linhagens celulares de câncer de mama comercialmente disponíveis. O aprisionamento de células em fases do ciclo celular onde não há proliferação parece ser o principal mecanismo. Possivelmente, por essas ações divergentes de fatores secretados, também são identificados discrepantes efeitos de populações celulares, podendo os adipócitos estimularem o crescimento tumoral e os pré-adipócitos o inibirem sob as mesmas condições. Outros fatores como estromalisina-3, matriz metaloproteinase e colágeno tipo VI também são implicados nessa relação tumor-estroma e parecem favorecer proliferação da neoplasia mamária *in vitro*. Estudos translacionais são apontados como o caminho para esclarecer essas questões.

A Société Française de Chirurgie Plastique Reconstructrice et Esthétique - SOFCPRE (2012) emitiu um parecer sobre o enxerto de gordura em mamas, revogando o anterior de 2008. Reconhecem o risco de formar calcificações que podem atrapalhar o rastreamento do câncer de mama e a incerteza acerca do aumento do risco de neoplasia mamária, embora não houvesse até o momento estudos comprovando esse aumento. Propuseram que a lipoenxertia para aumento primário das mamas fosse indicada a mulheres acima de 35 anos, sem antecedentes pessoais ou familiares de neoplasia mamária e com mamografia normal. Na reconstrução mamária, acreditavam que a gordura enxertada poderia se opor ao efeito da

radioterapia e aumentar a recidiva local. Sugeriram apenas indicá-la após três anos do controle da neoplasia em pacientes maiores de 50 anos, ou com intervalos maiores, conforme a idade das pacientes. Recomendaram também a criação de uma base nacional de dados sobre a lipoenxertia nas mamas.

A American Society of Plastic Surgeons - ASPS (2012) atualizou as recomendações quanto à lipoenxertia em mamas pós-mastectomia, realizadas previamente em 2009. Um comitê formado para avaliar a segurança dos pacientes foi designado para revisar a literatura. Detectaram que a lipoenxertia é efetiva e segura para a reconstrução de mama pós-mastectomia, quando não há tecido mamário residual, promovendo bom resultado estético e altos níveis de satisfação das pacientes, principalmente quando realizada em múltiplas etapas. Foram demonstrados bons resultados na síndrome de dor pós-mastectomia e na radiodermite. A revisão contabilizou baixos índices de complicações e não evidenciou aumento de recorrência ou dificuldades na detecção do câncer de mama após o enxerto de gordura.

KASEM et al. (2015) discorreram em sua revisão sobre as aplicações clínicas e as dificuldades iniciais da lipoenxertia, como a variável retenção volumétrica e os artefatos radiográficos. Destacaram que havia uma pobreza de estudos para regulamentação da técnica do enxerto gorduroso. A coleta era realizada, de modo geral, com cânula roma após infiltração de solução vasoconstritora. A preparação do enxerto seguia mais comumente a técnica de Coleman (1995), que consiste na coleta em seringas seguida de centrifugação da gordura, com descarte das camadas inferior e sobrenadante. Citaram o enriquecimento do enxerto com ASCs (transferência de gordura assistida por células) e fatores de crescimento e o preparo do leito por

expansão como estratégias para uma melhor retenção volumétrica. Em se tratando de evidências clínicas, apenas foi sugerida a possibilidade de maior recorrência em paciente com neoplasia intraepitelial que receberam lipoenxertia. Concluíram que, embora a experiência clínica sugira a segurança oncológica do enxerto de gordura, as pacientes com fatores de risco para recidiva local deveriam ser esclarecidas sobre os riscos potenciais dessa modalidade de reconstrução de mama.

AGHA *et al.* (2015) realizaram uma meticolosa revisão sistemática com metanálise sobre o uso de enxerto de gordura autólogo para reconstrução de mama. A maioria dos estudos selecionados foi avaliada como de baixa ou muito baixa qualidade. Os desfechos oncológicos foram avaliados e nenhuma correlação entre recorrência da neoplasia e enxerto de gordura foi encontrada. Quanto aos desfechos clínicos, esteatonecrose foi o achado mais comum, mas considerado de baixa gravidade requerendo mínima intervenção clínica ou observação. Desfechos estéticos relatados pelo paciente não foram avaliados nos estudos-base por métodos padronizados, o que limitou a análise. Desfechos radiológicos mostraram que 11,5% das pacientes apresentaram achados radiológicos e necessitaram de uma solicitação de mamografia extra no seu seguimento; e 2,7% necessitaram realizar biópsia, o que pode ter representado impacto psicológico negativo para esse grupo. Devido à baixa qualidade e heterogeneidade dos estudos disponíveis para inclusão, não foi possível realizar uma metanálise. Atestaram que a presente revisão sistemática deveria ser considerada com bastante cautela.

BERTOLINI, PETIT, KOLONIN (2015) escreveram um artigo de revisão sobre a influência do tecido adiposo branco utilizado em reconstruções de mama e a recorrência da neoplasia. A semelhança entre os componentes da fração estromal da gordura e os do microambiente tumoral levantaram hipóteses de que o enxerto gorduroso poderia favorecer o crescimento e a disseminação de tumores assim como apontaram para a possibilidade de um precursor comum entre as células estromais mesenquimais e os fibroblastos associados ao câncer. As células estromais do enxerto gorduroso reconheceriam o tumor como uma área de hipóxia/inflamação, migrariam em sua direção e secretariam localmente fatores angiogênicos e proliferativos. Estudos clínicos de metodologia rigorosa, porém retrospectivos, não comprovaram aumento de recorrência do câncer de mama em pacientes tratadas com lipoenxertia. Como soluções para essa aparente contradição, os autores propuseram a associação de cirurgiões plásticos com estatísticos a fim de revisar e fabricar evidências estatisticamente legítimas a partir de dados retrospectivos já existentes; melhoria de modelos experimentais ortotópicos para o estudo da gordura como capaz de promover a reconstrução de partes moles sem estimular recorrência ou metástase em tumores de mama; estudar pré-clinicamente e em ensaios clínicos a eficácia de intervenções que possam reduzir a recorrência da neoplasia mamária na população de pacientes candidatas a reconstrução com lipoenxertia, sejam essas farmacológicas (como o uso de metformina) ou não farmacológicas (como o combate à obesidade). Como conclusões, apontaram como prioridade a realização de revisões e estudos retrospectivos para que sejam estabelecidas, em curto prazo, medidas regulatórias que garantam a segurança das pacientes; e, em paralelo, estudos pré-clínicos e clínicos deveriam ser iniciados para fornecer evidências científicas acerca desse tratamento.

CHARVET *et al.* (2015) realizaram revisão não sistemática entre janeiro de 2010 e dezembro de 2014 nas bases *PubMed* e *Google Scholar* sobre o enxerto de gordura e a neoplasia mamária. Reuniram 16 estudos clínicos e nove estudos experimentais. A partir dos estudos *in vitro* e *in vivo*, concluíram que as ASCs poderiam criar um microambiente favorável ao aumento de tumorigenicidade das células do câncer de mama, seja por meio de interações célula a célula ou por meio de fatores secretórios. Além das ASCs, relataram estudos evidenciando implicações de progenitores endoteliais favorecendo a angiogênese tumoral. Destacaram ainda as evidências de aumento da expressão de genes associados à inflamação, proliferação, invasão e migração no tecido gorduroso adjacente à neoplasia mamária. Dentre os estudos clínicos, totalizaram 2100 pacientes com taxa de recidiva local de 2,2%. Nos estudos comparativos com grupo controle, apenas pacientes com neoplasia intraepitelial foram relatadas como portadoras de taxa de recorrência significativamente maior quando submetidas à lipoenxertia. Em suas conclusões, destacaram a dissociação entre achados clínicos e experimentais e teceram críticas aos delineamentos experimentais como o uso de linhagens celulares imortalizadas e de grandes concentrações de células-tronco, incompatíveis com a composição de um enxerto de gordura. Criticaram também os delineamentos clínicos, cuja falta de padronização técnica e de controles adequados, análise retrospectiva e seguimentos curtos determinam baixo nível de evidência.

DE DECKER *et al.* (2016) propuseram-se a realizar revisão sistemática para avaliar eficácia, segurança e complicações da lipoenxertia em mamas após cirurgia para o tratamento da neoplasia mamária. Consultaram as bases *Pubmed*, *Science Direct* e *Thomson Reuters Web of Science* em busca de artigos na espécie humana com enxerto de gordura em

mamas após neoplasia. Foram selecionados artigos originais em inglês e francês e submetidos à avaliação de qualidade pelo critério do *Oxford Centre for Evidence-based Medicine*. Foram reunidos dados numéricos de 2419 pacientes submetidas ao enxerto de gordura, na sua maioria preparada conforme a técnica de Coleman (1995), extraídos de áreas do abdome, coxas, glúteos e flancos, para reconstrução de mama após câncer. Destacaram não haver uma padronização técnica do preparo do enxerto, de modo que diversos autores fizeram pequenas modificações à técnica de Coleman (1995). O índice de satisfação foi de 75-95% de pacientes satisfeitas ou muito satisfeitas, e o índice de complicações menores como esteatonecrose, infecção, formação de cistos oleosos, seromas e hematomas foi abaixo de 10%. A recorrência local, pesquisada em todos os estudos, refletindo a preocupação atual com o tema, foi de 1,96% num seguimento de seis meses a 7,5 anos (comparado a 1,46% no grupo que sofreu mastectomia sem reconstrução e 2,17% no grupo submetido à cirurgia conservadora para o tratamento da neoplasia mamária sem reconstrução). As limitações mais evidentes discutidas no estudo foram a ausência de ensaios clínicos aleatorizados no assunto, seguida do período de seguimento variável dos estudos. O baixo índice de recorrência local teve como hipóteses a segurança oncológica do procedimento ou um viés de seleção, que consistia na indicação do enxerto de gordura em pacientes com melhor prognóstico e menor risco de recidiva por fatores oncológicos.

3.4. Estudos experimentais sobre o câncer de mama e a sua interação com o tecido adiposo

VONA-DAVIS & ROSE (2007) chamaram de adipocinas o grupo composto por leptina, adiponectina e fator de crescimento de hepatócitos (HGF), fatores secretados pelo tecido adiposo descobertos como importantes participantes dos mecanismos pelos quais a obesidade e as doenças metabólicas associadas a ela interferem no risco de câncer de mama. Seus efeitos poderiam ser diretos e indiretos por meio de ações endócrina, parácrina e autócrina. Relataram que a leptina atuaria primariamente no câncer de mama pela estimulação de receptores de estrógenos, mas também poderia atuar em vias metabólicas independentes do estrógeno. A adiponectina, um sensibilizador endógeno da insulina, foi apresentada como inibidora da proliferação de células neoplásicas e da angiogênese tumoral, e estimuladora da apoptose de células do câncer de mama. O fator de crescimento hepatocitário, por sua vez, foi descrito como promotor da invasão tumoral e estimulador da angiogênese.

WALTER *et al.* (2009) buscaram elucidar a interação entre o tecido adiposo e a progressão tumoral em neoplasia de mama estrogênio-independente. Realizaram estudo *in vitro* e em modelo animal com cotransplante em xenoenxerto de ASCs humanas e células neoplásicas. Obtiveram maior invasão e migração *in vitro* de células MCF7 e MDA MB 231 e maior invasão de MDA MB 231 *in vivo*. A cofilina, um importante regulador da dinâmica da actina, e a Interleucina-6 (IL-6) mostraram-se determinantes para a atividade promotora de invasão tumoral das ASCs.

Concluíram que o efeito pró-invasão das ASCs sobre a neoplasia mamária envolveria ação sobre o citoesqueleto.

SUN *et al.* (2009) realizaram um estudo com três modelos experimentais de neoplasia mamária diferentes: injeção local de células-tronco em tumor pré-estabelecido, coinjeções de células-tronco com células neoplásicas e injeção intravenosa de células-tronco em camundongo com tumor. Foram utilizadas a linhagem celular MDA MB 231, metastática e invasiva, e células-tronco derivadas de cordão umbilical e do tecido adiposo. A injeção intravenosa de células-tronco em camundongos levou à redução do volume tumoral e do índice de metástases. Foi detectada a migração das células-tronco para o sítio tumoral quando administradas na corrente sanguínea e o aumento da clivagem de proteínas vitais para a apoptose (caspase 3 e poli adenosina difosfato-ribose polimerase 1). Também no modelo de coinjeção, as células-tronco reduziram a formação e progressão tumoral e a ocorrência de metástases pulmonares. Concluíram que o potencial antineoplásico das células-tronco, embora bastante promissor, ainda necessita de estudos para sua aplicação.

JOTZU *et al.* (2010) investigaram a origem dos fibroblastos associados ao carcinoma, células que contribuem para o crescimento e a invasão tumoral e para a ocorrência de metástases, supondo que pudessem ser derivados de ASCs. Demonstraram que meio de cultura condicionado por MDA MB 231 e MCF7 induziu por meio do fator transformador de crescimento beta (TGF beta) um fenótipo de miofibroblasto nas ASCs, estimulando a expressão de actina alfa de músculo liso e tenascina-C. Essas ASCs transformadas apresentam ainda propriedades funcionais dos fibroblastos associados ao carcinoma como a habilidade de promover a

invasão tumoral, confirmado em ensaios de invasão *in vitro* e a secreção de fator derivado de células estromais 1 e de seu receptor.

DONNENBERG *et al.* (2010) revisaram os riscos do uso da terapia regenerativa em procedimentos reparadores após o tratamento do câncer, com ênfase principalmente na reconstrução de mama. Destacaram que o enriquecimento de enxertos gordurosos com células-tronco derivadas do tecido adiposo surge como uma estratégia para aumento dos índices de retenção, mas suscita o receio de que células com capacidade de autorrenovação, diferenciação e angiogênese possam favorecer a reativação de células tumorais adormecidas ou ocultas. Criticaram a falta de realismo clínico dos modelos experimentais em cocultura e xenoenxerto utilizando linhagens celulares e demonstram que os isolados de tumores primários continham subpopulações de células tumorais CD90+ ativas ou quiescentes, sendo as últimas células dormentes, de efeito subclínico, responsáveis pela recorrência após sobrevida livre de doença. Apontaram que o fator mais determinante do risco de recidiva tumoral, após uso de terapia regenerativa, é o estágio ativo ou dormente do tumor residual.

DIRAT *et al.* (2011) demonstraram interação bidirecional em cocultura de ASCs com células tumorais murinas e humanas. Nas células neoplásicas, houve aumento da invasão tumoral. Nas ASCs, houve redução da expressão de fenótipo adipocítico e ativação da secreção de proteases, como a metaloproteinase-11, e citocinas pró-inflamatórias como a IL-6. Essa citocina demonstrou importante papel no efeito pró-invasão tumoral das ASCs e estava superexpressa em adipócitos adjacentes aos tumores de maior tamanho e com acometimento linfonodal. Chamaram esses adipócitos adjacentes aos tumores, fenotipicamente modificados e secretores de IL-6,

de adipócitos associados ao câncer. Destacaram a importância de compreender essas interações em seu caráter cíclico, de modo que os tumores agem sobre as ASCs, induzindo nelas um fenótipo secretório que estimulará o crescimento e a invasão tumoral.

KUCEROVA *et al.* (2011) analisaram a influência das células-tronco do tecido adiposo na capacidade proliferativa de linhagens celulares da neoplasia mamária (MDA MB 361, T47D e MCF7). Todas as células testadas tiveram a proliferação estimulada pela presença das ASCs em cocultura ou do meio de cultura condicionado pelas ASCs, sendo o maior estímulo quando esse meio foi usado na proporção de 1:2 com meio não condicionado. Realizaram estudo dos receptores de fatores de crescimento expressos pelas linhagens de células neoplásicas, identificando o receptor de fator de crescimento de hepatócitos e o receptor para o fator derivado estromal 1 nas células MCF7. Detectou-se a expressão de fator de crescimento endotelial vascular A e B, fator de crescimento derivado de plaquetas, fator derivado estromal 1 alfa, fator de crescimento de hepatócitos, fator de células-tronco e ligante de citocina 5. Concluíram que a interação pró-proliferativa entre ASCs e células neoplásicas decorria tanto de fatores secretórios como do contato célula-célula. E a compreensão dessa interação seria fundamental para os avanços no uso das ASCs como elementos de terapia regenerativa no câncer.

ZIMMERLIN *et al.* (2011) realizaram estudo em isolados primários de efusão pleural metastática do câncer de mama para avaliar a interação de ASCs com células do câncer de mama. Caracterizaram nessa amostra tecidual, duas populações celulares distintas: células CD 90+ pequenas com fenótipo quiescente e menor expressão de marcadores epiteliais e de células-

tronco; células CD90+ grandes com grande proliferação e maior expressão dos marcadores citados. Em cocultura da população geral de células neoplásicas com ASCs, observaram o estímulo à proliferação de células tumorais. Em modelo de xenoenxerto com 100 células por sítio em glândulas mamárias, observaram um aumento de tumorigenicidade das células CD90+ grandes (ativas) quando em contato com ASCs, o que não foi observado nas células CD90+ pequenas (quiescentes). Concluíram que a ação das ASCs sobre diferentes subpopulações de células neoplásicas da mama depende dos requerimentos das células tumorais para a proliferação, podendo ser esses mais complexos do que a presença e o secretoma das ASCs. Dessa forma, em tumores quiescentes, as ASCs seriam potencialmente inócuas.

DEVARAJAN *et al.* (2012) estudaram o efeito das ASCs sobre a transição epitelial-mesenquimal, fenômeno em que as células neoplásicas mudam sua morfologia para fusiforme, perdem as junções celulares epiteliais, reorganizam o citoesqueleto e assumem propriedades de células-tronco. Demonstraram por experimentos *in vitro* que as ASCs induzem em células 4T1 do câncer de mama murino a expressão de fibronectina, actina alfa de músculo liso e vimentina. Também as células humanas de neoplasia da mama MCF7, BT474 e TD47 apresentaram aumento dos mesmos marcadores mesenquimais em detrimento da queda dos epiteliais, como a E-caderina. Meio de cultura condicionado por ASCs promove o crescimento independente de ancoragem de células das linhagens T47D, BT474 e MCF7. Esse efeito mostrou-se dependente de fator de crescimento derivado de plaquetas, podendo oferecer perspectivas para novas terapias-alvo contra essa citocina no câncer de mama.

WATERMAN, HENKLE, BETANCOURT (2012), baseados em estudos prévios que sugeriram a possibilidade de polarização de células-tronco mesenquimais (MSC) em direção a um fenótipo pró-inflamatório ou anti-inflamatório, estudaram a influência dessa polarização na interação das MSC com tumores de ovário, pâncreas e mama. As células com perfil pró-inflamatório diminuíram a proliferação tumoral, a migração e a invasão; e promoveram maior concentração de fatores inflamatórios e pró-apoptóticos. Em modelo animal de câncer de ovário, as MSCs pró-inflamatórias levaram a tumores menores, ausência de ascite ou metástases. As células com perfil anti-inflamatório tiveram resultados diametralmente opostos *in vitro* e *in vivo*. Destacaram, por fim, que a segurança, a fácil obtenção e expansão em cultura e a capacidade de imunomodulação e migração para sítios tumorais, são características que tornam as MSCs instrumentos ideais para o uso no tratamento do câncer. O novo modelo de polarização ajuda a compreender a complexa e, por vezes, contraditória interação entre câncer e células-tronco.

KUCEROVA *et al.* (2013) estudaram a ação de ASCs em neoplasia mamária positiva para o HER2, representadas pela linhagem SKBR3. Coculturas diretas na proporção de duas células neoplásicas para 1 (um) ASC e coculturas indiretas em meio condicionado por ASCs foram realizadas resultando em aumento da formação de mamosferas e transição epitelial-mesenquimal. Em ambas as modalidades de cultura, a proliferação de células neoplásicas foi reduzida de forma dose-dependente, por mecanismos que incluíram a ação do fator derivado de células estromais 1 alfa. Foi demonstrada ainda uma maior quimiossensibilidade a doxorubicina e 5-fluoracil das células SKBR3 em presença de ASCs, mas não para a cisplatina. Destacaram que a interação tumor/estroma determina o comportamento biológico do tumor e a sensibilidade ao tratamento

quimioterápico. Essa interação, no entanto, era dinâmica e poderia variar de acordo com o tipo de célula tumoral e, principalmente, com os estímulos que as ASCs recebem do microambiente em que estão inseridos.

BARTENEVA *et al.* (2013) realizaram revisão sobre as aplicações da distribuição celular automatizada e suas novas perspectivas. Relatam que a heterogeneidade intratumoral tem aumentado devido a pressões de seleção ambiental e o estudo da estrutura subclonal dos tumores ganha importância crescente. Os avanços recentes em lasers, tecnologia de computadores e óptica levaram ao surgimento de novas gerações de citômetros de fluxo e distribuidores celulares capazes de processar a altas velocidades soluções celulares. A combinação de tais equipamentos avançados com métodos de biologia molecular, proteômica e imagem têm contribuído para a caracterização de populações celulares primárias e metastáticas, doença residual e células tumorais isoladas. Esses métodos vêm sendo utilizados com frequência para a seleção de populações celulares para xenoenxerto, permitindo ainda a vantagem de selecionar células vivas dentre as apoptóticas e mortas, e células individuais dos agregados celulares, aspectos vitais na confecção dos xenoenxertos de pequenas quantidades de células.

BURDALL *et al.* (2013) discutiram sobre o uso de linhagens celulares na pesquisa translacional em câncer de mama. Apontaram como as principais vantagens delas a facilidade de manipulação, a alta replicação e a homogeneidade. No entanto, apontaram a possibilidade da emergência de subpopulações com diferentes características fenotípicas. Destacaram a MCF-7 como a linhagem celular de câncer de mama mais utilizada no mundo, mas ressaltaram que a maioria das linhagens trata-se de células metastáticas e representam melhor tumores rapidamente progressivos e de

estadiamento avançado. Evidenciaram as culturas primárias de tumor como excelente fonte de células para pesquisas, mas ainda limitadas pela dificuldade da padronização técnica dos procedimentos de explante e cultura, pela lenta replicação, pela rápida senescência e pela possibilidade de modificação fenotípica após isolamento e cultura. Concluíram que as distintas células neoplásicas da mama disponíveis para a pesquisa prestam diferentes contribuições e embasam a elaboração de diversos modelos experimentais, de modo que, apesar dos avanços constantes, todas elas mantêm, ao mesmo tempo, um rico potencial de contribuição para o conhecimento científico e uma série de limitações a serem consideradas.

RYU *et al.* (2014) estudaram as ASCs em culturas de alta densidade (40.000 células/cm²) e detectaram uma produção aumentada de interferon I (IFN). Foi detectado efeito indireto pelo meio de cultura condicionado por essas células suprimindo o crescimento de células MCF7 e MDA MB 231 *in vitro* por um mecanismo dependente de IFN beta ativando a via JAK-STAT. Também em cocultura de MCF7 e ASC em alta densidade, houve aumento de apoptose nas células neoplásicas. Foi realizada análise particularizada para checar se a redução de proliferação poderia se dever apenas à redução da disponibilidade de glicose devido à alta densidade celular. Detectaram que o efeito negativo sobre a proliferação e o estímulo à apoptose ocasionados pela privação de glicose eram intensificados na presença de IFN beta. Elaboraram a suposição de que também a ação do IFN beta pode ser usada como recurso terapêutico antineoplásico.

BIELLI *et al.* (2014) revisaram a caracterização das ASCs, o seu potencial de pluridiferenciação e as possíveis interações com o câncer de mama. A capacidade angiogênica das células-tronco, grande trunfo para seu

uso na medicina regenerativa, foi apontada como ponto crucial para favorecer o crescimento tumoral. A relação entre adipócitos maduros e células neoplásicas da mama foi dissecada pelos autores em seus aspectos parácrinos e endócrinos, revelando o efeito positivo das adipocinas sobre o câncer de mama. Em se tratando de ASCs os estudos revisados mostraram-se controversos, demonstrando aumento da proliferação e invasão tumoral em alguns casos, ação heterogênea em diferentes populações celulares de um mesmo tumor e capacidade de induzir a apoptose de células neoplásicas da mama. As ASCs também foram relatadas como potenciais agentes terapêuticos por meio do transporte de drogas citotóxicas e citocinas inibidoras de tumor, ou por meio de modificações genéticas (com uso de plasmídios virais) a fim de secretar agentes antitumorais.

ETERNO *et al* (2014) destacaram a contradição entre o promissor potencial regenerativo das ASCs e as preocupações com a segurança oncológica do uso do enxerto de gordura na reconstrução de mama. Propuseram um modelo experimental de ASCs combinadas a células saudáveis da mama e células neoplásicas primárias de doadores humanos *in vitro* e *in vivo* para o estudo das interações entre essas populações celulares. Foi demonstrado que as ASCs não tiveram efeito tumorigênico, sendo incapazes de estimular a formação de tumores a partir de células mamárias saudáveis. No entanto, estimularam a criação de um ambiente pró-inflamatório, exacerbando o comportamento tumorigênico de células neoplásicas positivas para o receptor do HGF (HGFR) e estimulando a proliferação e a angiogênese. Ainda foi evidenciado que o fator de crescimento hepatocitário age em seus receptores favorecendo o comportamento metastático e a invasão tumoral. Por imuno-histoquímica, foi elucidado que pacientes com tumores recorrentes expressam maiores

quantidades de HGFR que pacientes sem recorrência. Dentre as linhagens celulares utilizadas, as ASCs estimularam a proliferação e a invasão de células MDA MB 231, mas não das MCF7, que apresentaram menor expressão de HGFR. Propuseram que a expressão do receptor de HGF pode ser um fator preditivo do risco de recidiva tumoral após uso de lipoenxertia na reconstrução de mama, podendo auxiliar a individualização da indicação desse procedimento.

SUN *et al.* (2014) revisaram os efeitos do microambiente tumoral inflamatório na ação de MSCs. Relataram que o comportamento biológico de um tumor era determinado não apenas pelas células componentes do tumor, mas também pelas células que integram o microambiente tumoral. As MSCs eram parte desse grupo de células, seja como residentes ou atraídas pela característica inflamatória do microambiente. A migração das MSCs poderia ser estimulada por diversos fatores como fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa), IL1-beta, IFN gama, IL-6, fator derivado de células estromais 1 (SDF-1), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e HGF. Uma vez instaladas no ambiente peritumoral, as MSCs poderiam continuar como MSCs, diferenciarem-se como miofibroblastos associados ao tumor ou como células endoteliais, resultando em efeito positivo sobre o crescimento e a invasão tumoral. Foi detectada, no entanto, a existência de MSCs de origem tumoral, que exibiram alterações cromossômicas semelhantes às dos tumores, grande capacidade proliferativa e de diferenciação. As MSCs de origem extratumoral apresentaram efeitos bidirecionais sobre os tumores, podendo aumentar a proliferação, induzir apoptose, reduzir angiogênese, aumentar células-tronco neoplásicas e suprimir resposta imune antitumoral. Esses efeitos contraditórios foram justificados pelos diferentes delineamentos experimentais e, pela limitação

inerente dos estudos *in vitro* ao representar fenômenos isolados em cada experimento. As MSCs tumorais exibiram efeitos muito mais contundentes no favorecimento à progressão tumoral por meio de efeito imunossupressivo local, estímulo à proliferação e transição epitelial-mesenquimal e aumento de células-tronco neoplásicas. Na realidade, foram citados estudos recentes que sustentam a hipótese de polarização das MSCs para fenótipos pró ou antitumorígenicos a depender do perfil secretório do microambiente em que estão inseridas. Dessa forma, o microambiente tumoral, rico em citocinas pró-inflamatórias como TNF alfa e IFN gama estimularam as MSCs a secretar fatores pró-metastáticos, pró-angiogênicos, genes relacionados à multipotência de células tumorais, criando um círculo de autossustentação da neoplasia. Concluíram que o estudo dessa estratégia de proteção tumoral pode abrir excelentes perspectivas para novas propostas terapêuticas.

RITTER *et al.* (2015) compararam ASCs provenientes da gordura subcutânea e visceral demonstrando diferenças morfológicas, menor potencial de diferenciação na porção subcutânea, mesmo perfil de marcadores de superfície e secreção. As ASCs de ambas as origens foram atraídas por células de neoplasia mamária (MDA MB 231 e MCF7), de neoplasia cervical (HeLa) e fibroblastos, mas não por epitélio mamário normal (MCF10); sendo esse efeito maior nas de origem subcutânea. Ambos os tipos de ASCs foram capazes de estimular a proliferação de MCF7, mas não de MDA MB 231 em cocultura direta e não na indireta, indicando a necessidade de contato celular para tanto. Em sistemas *transwell*, ASCs foram capazes de induzir transição epitelial-mesenquimal em MCF7, sendo as viscerais mais rápidas e eficazes que as subcutâneas, em acordo com o perfil secretório. Dentre as diversas vias fisiológicas, a do inibidor de fosfatidilinositol 3-quinase teve papel chave. Em experimentos de migração

e invasão, as ASCs viscerais foram capazes de estimular as MCF7 (células naturalmente menos invasivas), mas não alteraram as MDA MB 231 (células naturalmente metastáticas e invasivas). Concluíram que a demonstração de efeitos pró-tumorigênicos das ASCs é evidente, mas novos estudos clínicos e experimentais devem ser feitos para elucidar riscos da lipoenxertia nas pacientes com câncer de mama.

FEISS, MEIDINGER, LOCKE (2015) revisaram o potencial terapêutico do uso de ASCs. A caracterização dessas células, ponto inicial a ser padronizado parece bem estabelecida. As vias de administração podem ser sistêmicas ou locais, de modo que, na administração sistêmica, observou-se a valiosa propriedade de localização em sítios tumorais ou de doenças inflamatórias. Inicialmente acreditava-se que a capacidade de diferenciação das ASCs era o seu maior potencial terapêutico, entretanto, estudos mais atuais indicaram que a modulação de microambiente, o secretoma e a ação imunomodulatória são efeitos muito promissores. Citam pesquisas mais atuais que vêm pré-condicionando ASCs a fim de exacerbar a sua capacidade de localização em sítios específicos ou favorecer um determinado perfil secretor desejado. No campo do transporte de drogas, além do simples carregamento da droga ao sítio desejado, têm-se realizado coadministração de ASCs com drogas e pró-drogas para potencializar o efeito dessas por meio de reações enzimáticas ou secreção parácrina. Esses potenciais vêm sendo explorados atualmente por 177 ensaios clínicos em humanos registrados na plataforma *Clinical Trials*.

SCHWEIZER *et al.* (2015) destacaram em sua revisão narrativa que o uso de gordura como preenchedor natural das mamas nas reconstruções após ressecções tumorais tem excelentes resultados estéticos, mas carece de

confiabilidade quanto à taxa de retenção. Dessa dificuldade, motivou-se o surgimento dos enxertos gordurosos enriquecidos com ASCs para aumentar a integração da gordura. No entanto, levantaram a dúvida de se as células-tronco poderiam promover proliferação, diferenciação e metástases ou estimular novos focos de carcinogênese. As ASCs tiveram suas propriedades antiapoptótica, pró-angiogênica, anti-inflamatória, imunomoduladora e antifibrose, amplamente estudadas pelos estudos revisados. Destacaram como as principais publicações recentes: 13 estudos experimentais *in vitro*, dos quais 100% indicaram aumento de proliferação e migração de células de múltiplas linhagens neoplásicas e isoladas primários na presença de ASCs ou do meio de cultura por elas condicionadas; 13 estudos experimentais *in vivo*, dos quais apenas um apontou para a redução do tamanho de tumores em presença de ASCs. Discorrem ainda sobre os mecanismos célula-célula, parácrinos e endócrinos pelos quais as ASCs podem estimular a migração, a invasão e a transição epitelial-mesenquimal da neoplasia mamária. As repercussões clínicas da lipoenxertia em mamas previamente tratadas para câncer, antes concentradas em artefatos radiológicos no rastreamento e seguimento mamográfico, foram redirecionadas para questões de segurança oncológica em virtude da atividade biológica das ASCs. Ressaltaram não haver, até o momento, evidências clínicas que sustentem as preocupações geradas pelos estudos experimentais. Concluíram que a solução da discordância entre estudos clínicos e pré-clínicos passaria pela elaboração de modelos experimentais mais congruentes com a necessidade de translação do conhecimento e com a realização de estudos clínicos com metodologia adequada à avaliação de risco de recidiva e seguimento longo.

3.5. Modelos experimentais em câncer de mama

SOULE *et al.* (1973) relataram a cultura de longo prazo de células epiteliais mamárias neoplásicas humanas provenientes de derrame pleural neoplásico as *Michigan Cancer Foundation 7* (MCF7). A paciente-fonte era uma mulher caucasiana, tipo sanguíneo O positivo, com história de mastectomia esquerda três anos antes do início da cultura, recidiva em parede torácica, radioterapia e hormonioterapia. As células sobrenadantes da efusão pleural foram cultivadas em meio mínimo essencial de Eagle, com adição de antibióticos e soro fetal bovino. Relataram dificuldades com o supercrescimento de fibroblastos em algumas culturas, que sofreram descarte, senescência e morte celular precoce, e baixa sobrevivência das células às múltiplas transferências, superada ao utilizarem as células já sobrenadantes. As células observadas após múltiplas passagens exibiam morfologia epitelial, com forma poligonal e tendência à formação de aglomerados em rosetas ao atingirem a confluência. O padrão cromossômico dessas células era tipicamente humano, com predominância metacêntrica e subtelocêntrica. A confirmação da natureza humana das células também foi feita por imunofluorescência com marcadores de superfície das membranas celulares específicos antissoro humano, e por meio da determinação do peso molecular do RNA ribossomal. As células foram testadas para presença de micoplasma em cultura, obtendo resultado negativo. Concluíram sugerindo perspectivas para estudos com essa linhagem celular para isolamento de vírus no câncer de mama humano.

OSBORNE, HOBBS, TRENT (1987) estudaram as diferenças em propriedades biológicas de células MCF-7 provindas de diferentes fornecedores na intenção de compreender resultados conflitantes publicados. Quatro fornecedores diferentes foram estudados: células provenientes diretamente da *Michigan Cancer Foundation* (MCF) em passagem 200; células que vieram da MCF e foram cultivadas por 10 anos no laboratório dos autores em passagem 300; células obtidas do *National Institute of Health* (NIH) em passagem 300; e células obtidas da *American Type Culture Collection* (ATCC). A morfologia das células em cultura de monocamada foi semelhante. A análise cromossômica revelou que células da ATCC não apresentavam alterações cromossômicas, ao contrário das demais, que exibiam padrão semelhante dessas alterações. Todas as linhagens testadas tinham quantidades variáveis de receptores para estrógeno e progesterona. A taxa de crescimento das células da ATCC era 50% mais baixa que as demais e não era afetada por tratamento com estrógeno ou antiestrógenos. A clonogenicidade das linhagens variou em até 10 vezes. A tumorigenicidade em camundongos atímicos exibiu grande variabilidade entre as linhagens, sendo que a da ATCC cresceu sem necessidade de suplementação estrogênica e não foi inibida por antiestrógenos, enquanto as demais tiveram comportamento oposto. As diferenças cariotípicas e biológicas da MCF-7 distribuída pela ATCC, além de polimorfismos gênicos já relatados previamente, levaram a crer que essa linhagem é derivada de um paciente completamente diferente em relação às demais. No entanto, esse fato não invalidaria os estudos utilizando linhagens de diferentes procedências, mas impõe ressalvas à comparação entre eles.

HOVEY, MCFADDEN, AKERS (1999) publicaram uma revisão narrativa sobre as variações do crescimento e da morfogênese mamária entre as espécies, destacando que esses fenômenos são regulados por um grande conjunto de fatores locais e sistêmicos. O corpo gorduroso da mama, composto por tecido adiposo e conectivo, foi apontado como agente central dessa regulação por sua capacidade de mediar ação hormonal e sintetizar inúmeras moléculas regulatórias do crescimento mamário como proteases, fatores de crescimento e componentes da matriz extracelular. Os diferentes elementos celulares e estruturais do corpo gorduroso da mama entre as espécies de roedores, mamíferos ruminantes e seres humanos foram destacados como motivo fundamental para os distintos processos de desenvolvimento do parênquima mamário. Sugeriram que em caso de comparações de fenômenos proliferativos e morfogênicos da mama entre espécies, como nos modelos experimentais de xenoenxertos, tais diferenças devem ser levadas em consideração a fim de evitar extrapolações indevidas.

WAGNER (2003) realizou uma revisão crítica dos modelos animais em câncer de mama exaltando a sua contribuição inestimável para o avanço do conhecimento dos mecanismos moleculares e celulares da tumorigênese. No entanto, muitas críticas foram feitas a esses modelos, principalmente baseadas nas diferenças fisiológicas interespecies e nos distintos caminhos genéticos para o surgimento tumoral em murinos em humanos. O autor apontou que o um modelo experimental ideal para o câncer de mama deveria refletir a doença humana em seus aspectos etiológico, genético e fisiopatológico; garantir formação tumoral em 100% dos animais manipulados e apresentar pequena latência para o surgimento de tumores. Destacou que os xenoenxertos apresentavam a vantagem de ser menos custosos que os a manipulação genética dos animais, no entanto, formavam

tumores rapidamente e careciam de um ambiente estromal adequado para o tumor. Criticou também a necessidade do uso de animais imunossuprimidos nos modelos com células neoplásicas humanas, uma vez que muitos recursos terapêuticos a serem estudados dependem de um sistema imune intacto. Concluiu que por tratar-se de patologia muito heterogênea, certamente a neoplasia mamária não apresentará um modelo experimental ideal único, mas diversos modelos adequados ao estudo de suas diferentes facetas.

CHENG *et al.* (2009) fizeram um experimento com células murinas não metastáticas de neoplasia mamária (67NR), que crescem formando esferóides. Esses aglomerados tumorais organizados foram submetidos ao estresse sólido em gel de agarose e detectou-se que a forma dos esferóides é ditada pela forma do campo externo de pressão mecânica e esse efeito decorre da supressão da proliferação e da indução de apoptose desencadeadas pelo estresse mecânico. A morte celular programada pela pressão externa demonstra aumento da ação da caspase 3, superior ao visto na privação de nutrientes, e ocorre pela via metabólica mitocondrial, podendo ser inibida pela superexpressão do gene Bcl-2.

HOLLIDAY & SPEIRS (2011) discorreram sobre a difícil escolha da linhagem celular correta para a pesquisa, uma vez que a neoplasia mamária é uma doença complexa e heterogênea. Relataram que as linhagens celulares fornecem um suprimento infinito de população celular relativamente homogênea com replicação em meio de cultura. Destacaram a MCF7 como a linhagem mais utilizada em estudos da neoplasia mamária, devido à positividade para receptor de estrógeno. Desde a classificação molecular entre tipos luminal A e B, basal, HER-2 positivo e normal, a comunidade de pesquisadores tem se voltado para definir que linhagens celulares

representariam os diferentes tipos moleculares de tumores. A MCF7 é citada como a principal representante dos tumores luminais A, tipo mais prevalente na população mundial. Relataram a inclusão de modelos tridimensionais como uma perspectiva de novos estudos. Em se tratando de modelos de xenoenxertos, destacaram a importância do estroma e a realização do enxerto ortotópico. Lançaram a perspectiva de desenvolver linhagens celulares que representem tipos mais raros de tumor, como o câncer de mama masculino. Concluíram que os estudos em linhagens celulares permitiram consideráveis avanços na compreensão da biologia da neoplasia mamária.

TSE *et al.* (2012), baseados em estudos prévios sugerindo que a compressão mecânica pode induzir um fenótipo mais maligno e agressivo em tumores mamários, testaram 5 linhagens celulares diferentes em ordem crescente de potencial invasivo, incluindo a MCF-7. Observaram que o estresse mecânico em intensidade semelhante ao existente no microambiente tumoral do câncer de mama promoveu aumento da migração e invasão em linhagens mais agressivas e que já tinham sofrido transição epitelial para mesenquimal. No caso das MCF10 e MCF7, houve, na verdade, supressão da invasão. Esse aumento da migração envolveu mudanças evidenciadas na organização do citoesqueleto e células da periferia tumoral tomam a liderança no processo de migração secretando fibronectina para a adesão celular aos substratos durante a invasão.

PICKERING, BAST JR, KEYOMARSI (2015) questionaram como recrutar, treinar e manter médicos na Pesquisa Translacional. Destacaram a importância da Pesquisa Translacional como ponte que liga a pesquisa básica experimental e a pesquisa clínica. Os achados clínicos, as imagens e os espécimens obtidos de pacientes deveriam retornar aos laboratórios de

ciência básica para orientar a elaboração e o refinamento de delineamentos das pesquisas experimentais. Apontaram a queda da participação dos médicos em atividades de pesquisa e estabeleceram como desafios para frear essa queda o complexo treinamento em pesquisa básica, a má remuneração, o escasso tempo para dedicação à pesquisa e a dificuldade em estabelecer uma verba específica nas universidades para estimular o treinamento desses profissionais. Aos profissionais de ciência básica, sugerem a participação em programas universitários que permitam a convivência com a prática clínica, ainda que observacional, a fim de compreender a importância da relevância clínica nas pesquisas de laboratório, de modo que possam compreender os contextos mais amplos em que estão inseridos os objetos de seus experimentos. O estabelecimento de grupos multidisciplinares com médicos e cientistas foi aventado como uma possibilidade de combinar esforços na intenção de ampliar a realização da Pesquisa Translacional e poder transpor seus benefícios aos pacientes, objetivo final da pesquisa na área de saúde.

STYLIANOPOULOS (2017) produziu uma revisão narrativa sobre a mecânica de sólidos no câncer. Destacou que o desenvolvimento de um tumor sólido está intimamente associado com a geração e o acúmulo de estresse mecânico ao seu redor, que pode agir de forma direta ou indireta sobre o tumor. A ação direta consistia na compressão celular e reduzia a proliferação, induzia a apoptose e aumentava o potencial metastático. A ação indireta dava-se por meio da compressão de vasos sanguíneos e linfáticos, o que resultava no binário hipoperfusão/hipóxia e na elevação da pressão intersticial criando um gradiente centrífugo de fatores de crescimento e células tumorais. A hipóxia tumoral seria fomentadora do seu crescimento e da sua resistência a tratamentos, contribuindo para a redução da atividade de células imunes, indução de um perfil de célula-tronco neoplásica, promoção

da transição epitelial-mesenquimal, indução da angiogênese e redução da eficácia da radioterapia. Ambas hipoperfusão e hipertensão intersticial também constituíam barreiras à distribuição de drogas antineoplásicas no microambiente tumoral. Lançou a perspectiva de que a compreensão da biomecânica tumoral e o uso de estratégias para aliviar o estresse mecânico no microambiente tumoral seriam campos promissores para estudos em terapia antineoplásica.

3.6. Avaliação prognóstica do câncer de mama

HAYBITTLE *et al.* (1982) fizeram um estudo com modelo estatístico de regressão múltipla pelo método de Cox para analisar possíveis fatores prognósticos em relação à sobrevida no câncer de mama. Esse método permitiu estudar as variáveis independentemente, mas considerando o efeito de todas as outras variáveis. Foram testados idade, status de menopausa, tamanho do tumor, envolvimento linfonodal, reação celular, presença de seios histiocitários nos linfonodos, positividade para receptores de estrógeno e grau histológico, segundo Bloom & Richardson. 387 pacientes portadoras de neoplasia primária da mama foram incluídas no estudo. O tamanho do tumor, o grau histológico e o estado de acometimento dos linfonodos demonstraram correlação com a sobrevida livre de doença em cinco anos. A partir desses dados, desenvolveram uma fórmula numérica para determinar o prognóstico e confeccionar curvas de sobrevida, o índice prognóstico de Nottingham.

TODD *et al.* (1987) utilizaram o método numérico de cálculo prognóstico descrito por HAYBITTLE *et al.* em 1982 em uma nova população e na mesma população do estudo original com um seguimento mais longo. Provaram que o cálculo prognóstico é válido por um período de até 78 meses e para grupos com tumores de agressividade alta, intermediária ou baixa. Concluíram que poderiam ser derivados do índice de prognóstico de Nottingham perfis preditivos de sobrevida em pacientes com neoplasia primária da mama tratadas com mastectomia, permitindo estratificar as pacientes. Esse índice poderia ser usado para comparar modalidades terapêuticas novas com tratamentos tradicionais.

ELSTON & ELLIS (1991) destacaram a grande quantidade de evidências em favor da utilidade prognóstica do grau de diferenciação tumoral no câncer de mama. No entanto, reconheceram que a reprodutibilidade e consistência eram os principais obstáculos para a sua aceitação como procedimento de rotina. Utilizaram o método de Bloom & Richardson (1957) e modificaram-no para uma avaliação semiquantitativa de três características morfológicas: porcentagem de formação tubular, grau de pleomorfismo nuclear e contagem mitótica em campo definido. A cada característica foi atribuída uma pontuação numérica e a somatória define o grau histológico final entre três categorias. Utilizaram esse escore modificado por 18 anos em 1831 pacientes com neoplasia primária da mama, demonstrando forte correlação com a sobrevida e sugerindo boa reprodutibilidade. O grau histológico passou a compor o índice prognóstico de Nottingham, associado ao tamanho tumoral e o status linfonodal.

ELLIS *et al.* (1996) compararam a utilidade do anticorpo anti-Ki67 MIB 1 em relação a uma outra medida de proliferação consagrada, a fração de células em fase S do ciclo celular. A grande vantagem em relação aos demais anticorpos anti-Ki67 prévios consistia no fato de o MIB-1, um anticorpo recombinante contra partes desse antígeno, ser adequado ao uso em espécimes fixados em formalina, e não apenas em espécimes congeladas. A mesma lesão de neoplasia mamária de cada paciente era submetida a dois métodos: citometria de fluxo na amostra de punção por agulha fina para calcular a fração celular em fase S; e a fixação em formalina e a coloração com MIB-1 para o cálculo de um escore de positividade. Uma íntima correlação foi encontrada entre esses dois métodos e a imuno-histoquímica para MIB-1 foi considerada um método efetivo para avaliar a proliferação celular em neoplasias mamárias.

PEROU *et al.* (2000) publicou o que chamou de “retratos moleculares dos tumores de mama humanos”. Por meio do estudo da variação de padrões de expressão gênica em 65 peças cirúrgicas provenientes de 42 pacientes portadoras de neoplasia mamária, realizaram a classificação dessa neoplasia em subtipos de acordo com características moleculares. Apontaram que os tumores têm uma variação na expressão gênica ampla e multidimensional, que reflete as relações entre genes, entre os tumores e as conexões entre genes e tumores. Conforme a expressão de determinados grupos de genes, as neoplasias foram divididas em basais ou luminais, refletindo o tipo predominante de célula epitelial e a positividade para o receptor de estrógeno. Um grupo específico de tumores apresentou hiperexpressão de HER-2 e outro apresentou perfil semelhante ao tecido mamário normal. Um achado de destaque foi o fato de essas características permanecerem

preservadas em amostras pareadas de linfonodos metastáticos, sugerindo a retenção da programação molecular do tumor primário nas metástases.

BOTTINI *et al.* (2001) demonstraram a relação entre a redução de volume e da expressão de Ki67 em neoplasia mamária humana após quimioterapia (QT) primária. Num estudo clínico com 157 pacientes submetidas à QT neoadjuvante e tratamento cirúrgico, foram avaliados, antes e após a QT, tamanho tumoral, Ki67, p53, bcl-2, c-erbB2 e receptores de esteróides. A redução de mais de 50% do tamanho tumoral foi observada em 72,4% dos pacientes e correlacionou-se em análise uni e multivariada com o decréscimo na expressão de Ki67. Os demais aspectos estudados foram pouco afetados pela QT, o que permitiu compreender que ela teve bom efeito na redução do tumor e na redução das células em fases ativas do ciclo celular, mas não na biologia e agressividade do tumor. Nesse estudo, o Ki67, apesar de correlacionar-se à resposta clínica, não apresentou relação com o prognóstico em termo de sobrevida livre de doença.

VERONESI *et al* (2002) apresentaram um seguimento de 20 anos a partir do início do uso da cirurgia conservadora no tratamento do câncer de mama. Na década de 70, foi iniciado um ensaio clínico aleatorizado para a comparação entre as chamadas quadrantectomias e as mastectomias radicais. Ainda no final da mesma década, publicaram resultados preliminares demonstrando taxas de sobrevida equivalentes. No entanto, tais resultados foram criticados por seu curto período de seguimento. Os autores mantiveram, então, por 20 anos o seguimento de 701 pacientes com tumores menores que dois centímetros e sem linfonodos palpáveis, aleatorizadas em um grupo tratado com mastectomia (N=349) e outro tratado com cirurgia conservadora da mama (N=352). A recorrência tumoral foi

significativamente maior no grupo da quadrantectomia (0,63 por 100 mulheres-ano) comparado ao da mastectomia (0,17 por 100 mulheres-ano), e ocorreu, em média, após 92 meses de seguimento. No entanto, as taxas de sobrevida global e câncer de mama-específica em 20 anos não apresentaram diferença. Esses resultados corroboraram o estudo prévio dos autores e a sua hipótese de que o tratamento da doença não interfere na sobrevida, mas sim os acometimentos metastáticos. Propuseram na conclusão a quadrantectomia como uma modalidade segura de tratamento da neoplasia mamária, capaz de beneficiar um grande número de pacientes em termos de qualidade de vida.

HARRIS *et al.* (2007) publicaram uma recomendação atualizada da *American Society of Clinical Oncology* sobre o uso de marcadores tumorais no câncer de mama. Utilizaram o método de revisão crítica de artigos publicados e indexados nas bases *MEDLINE* e *Cochrane Collaboration Library* desde o ano de 1999, analisados por um comitê de especialistas. Os marcadores cujo uso clínico é recomendado são: CA 15-3, CA 27.29, antígeno carcinoembrionário, receptor de estrógeno, receptor de progesterona, HER-2, uroquinase ativadora de plasminogênio, inibidor do ativador de plasminogênio tipo 1 e ensaios multiparamétricos de expressão gênica. Quanto ao Ki67, declararam não haver estudos suficientes para recomendar seu uso clínico como fator prognóstico. As principais dificuldades na interpretação da literatura sobre esse marcador residiam na falta de padronização de reagentes utilizados, procedimentos para preparo histológico e contagem celular para elaboração do índice, impedindo a comparação exata entre diferentes estudos.

JONAT & ARNOLD (2011) revisaram estudos sobre o Ki67 a fim de justificar o seu uso clínico. Relataram que o Ki67 é um anticorpo monoclonal que reage com uma proteína nuclear não histona presente exclusivamente em células que estão se proliferando, ou seja, nas fases G1, S, G2 e M do ciclo celular, mas não na fase G0 das células quiescentes. A sua expressão é crescente em direção à fase de mitose. Relataram estudos com o Ki67 e apontam esse método como custo-efetivo e promissor para determinar prognóstico e sensibilidade a regimes terapêuticos. No entanto, reconheceram a necessidade de mais estudos no assunto e padronização técnica e analítica para adotar de modo corrente o uso de índice de Ki67 na prática clínica.

TASHIMA *et al.* (2015) relataram que o índice de Ki67 seria um importante biomarcador de proliferação e efetivo fator de prognóstico no câncer de mama, contando com uma metodologia de fácil aplicação e reprodutibilidade. No entanto, carecia de um ponto de corte numérico padrão. Realizaram um estudo retrospectivo com 4329 amostras de tumores primários. Em análise uni e multivariada, o índice de Ki67 apresentou-se como fator significativo para sobrevida global e livre de doença. Vários valores de ponto de corte foram testados e o valor de 20% teve a melhor correlação com o risco de mau prognóstico, considerando-se apenas o subtipo luminal A (HER 2 negativo). Nos demais subtipos, os diferentes valores de Ki67 não se correlacionaram à sobrevida global. Também nesse estudo, o tamanho do tumor apareceu como um fator prognóstico estatisticamente significativo para a sobrevida global.

CHO *et al.* (2016) dedicaram-se também a estudar um possível ponto de corte numérico para o índice de Ki67. Além disso, propuseram-se a comparar dois métodos de contagem para definição do índice de Ki67: um método manual estimado (contagem por estimativa visual de todo o slide) e um método semiautomatizado (com auxílio de fotografias microscópicas e de *software* de processamento de imagem). Avaliaram materiais de tumores primários, invasivos e ressecáveis. Em análise univariada, o tamanho tumoral, grau histológico, grau nuclear, *status* linfonodal, positividade para receptores hormonais, status de HER2 e o índice de Ki67 (com valores de corte de 14% ou 20%) foram apontados como fatores prognósticos de sobrevida específica ao câncer de mama. As melhores correlações entre os métodos manual e automatizado de contagem do índice de Ki67 foram encontradas no ponto de corte de 20%, assim como também nesse valor foi encontrada a melhor correlação prognóstica com sobrevida específica ao câncer de mama em pacientes portadoras de neoplasia com receptores hormonais positivos e linfonodos metastáticos. Destacaram que a escolha do ponto de corte do índice de Ki67 pode variar de acordo com o objetivo clínico, como excluir pacientes com tumores pouco proliferativos de supertratamento, selecionar pacientes sensíveis à quimioterapia ou realizar estimativas de sobrevida.

MÉTODO

4. MÉTODO

4.1. Desenho de pesquisa

Trata-se de estudo primário, intervencional, experimental, longitudinal, prospectivo, analítico, controlado, aleatorizado.

Todos os cuidados e procedimentos realizados nos animais foram revisados e aprovados pelo *Institutional Animal Care and Use Committee* da Universidade de Pittsburgh (Pittsburgh, Pennsylvania, EUA) sob o número 1506677 (Apêndice 1), e pela Comissão de Ética em Uso de Animais da Universidade Federal de São Paulo, parecer número 9923060814 (Apêndice 2).

O presente estudo foi financiado pelo National Institute of Health e pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior por meio de bolsa no Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior.

O delineamento do presente estudo e a elaboração de todos os manuscritos dele advindos foi feita considerando-se o *ARRIVE Guideline* (KILKENNY *et al.*, 2010).

4.2. Amostra

Os animais utilizados no presente estudo foram camundongos do tipo NOD-SCID gamma (Jackson Laboratory - Bar Harbor, ME, Estados Unidos da América, EUA - número de estoque 005557), caracterizados pela deficiência de linfócitos T e B maduros, de *natural killers* ativos, de macrófagos e células dendríticas, e da sinalização por meio de citocinas.

Para o experimento em questão, 40 fêmeas com idade entre oito e dez semanas, peso médio de 22,1 gramas (g) +/- 1,8g foram adquiridas do referido laboratório e mantidas por uma semana para aclimatação no biotério da Universidade de Pittsburgh (Pittsburgh, Pennsylvania, EUA). Foram acomodadas em gaiolas em grupos de cinco animais, identificadas por perfuração de pavilhão auricular, com água e ração animal adequada (*Labdiet*[®], Saint Louis, MO, EUA) *ad libitum*, ciclo claro-escuro de 12/12 horas e em ambiente livre de patógenos.

O cálculo amostral foi realizado com base em um estudo-piloto (Apêndice 3) e teve como objetivo um poder de 91,3% para detectar diferenças de uma vez e meia em tamanho de tumores, correspondendo a uma diferença de aproximadamente 0,4 milímetros de diâmetro, com nível de significância de 0,05.

4.3. Delineamento de pesquisa

Os animais utilizados no estudo foram distribuídos de forma aleatória em dois grupos de acordo com a intervenção a serem submetidos. A aleatorização foi realizada por *clusters*, sendo que as gaiolas foram submetidas a sorteio para definição de que intervenção seria aplicada a todos os animais habitantes de cada uma delas.

Todos os animais foram submetidos ao xenoenxerto de células neoplásicas num primeiro momento, conforme descrito a seguir. Duas semanas após o início do experimento, metade dos animais foi alocada no grupo salina e recebeu intervenção com injeção de solução salina estéril, enquanto a outra metade dos animais foi alocada no grupo lipo e recebeu

injeção de enxerto de gordura humana, conforme detalhado no item Procedimentos.

4.4. Procedimentos

4.4.1. Xenoenxerto de células MCF7

A primeira intervenção realizada nos animais foi a inoculação de xenoenxertos de células de neoplasia mamária da linhagem MCF7, adquiridas por meio de compra da *American Type Culture Collection* (Manassas, VA, EUA).

As células MCF7 são humanas, com morfologia epitelial e derivadas de efusão pleural de um adenocarcinoma mamário de paciente do gênero feminino, caucasiana e de 69 anos. São comercializadas criopreservadas sob protocolo-padrão. Expressam receptores de estrógeno e de fatores de crescimento semelhantes à insulina. Mantém diversas características de epitélio mamário diferenciado como o processamento de estradiol por via citoplasmática e a capacidade de formar aglomerados celulares. Todos os procedimentos envolvendo células foram realizados em cabines de cultura celular classe II de biossegurança.

As células foram mantidas em cultura em meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), com soro bovino fetal 10%, penicilina / estreptomicina 1% (Penicilina 10.000 unidades/mililitros- U/ml - e Estreptomicina 10.000 microgramas/ml - µg/ml) e anfotericina B 0,5% (anfotericina B 250 µg/ml), em estufas com condições controladas de 37 graus Celsius (°C) e 5% dióxido de carbono, sendo observadas diariamente

por microscopia e sofrendo troca de meio de cultura a cada três dias. Todos os produtos para cultura celular foram adquiridos da BioWhittaker® Lonza® (Basel, Suíça), exceto quando especificada outra procedência.

No dia do experimento, as células encontravam-se em 70% de confluência. Foram submetidas à digestão enzimática com tripsina acondicionadas em meio de transporte composto por DMEM/F12 1:1, soro bovino fetal 20%, ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinoetanossulfônico-HEPES 1 milimol (mM), 2-mercapto-etanol 50 mM.

Duas alíquotas celulares foram preparadas: a de células carregadoras e a de células ativas. As células carregadoras foram submetidas à irradiação com 100 grays (Gy) em um irradiador *Gammacell 1000*® (Nordion®, Ottawa, Canadá) para sua inativação proliferativa, contudo mantendo sua viabilidade (Figura 1). O objetivo das células carregadores era garantir que o máximo de células ativas chegasse aos animais, reduzindo a chance de quantidade significativa das células ativas ficarem detidas nas placas de poços, seringas ou agulhas utilizadas no procedimento de xenoenxerto, uma vez que estariam dispersas num número 10 vezes maior de células carregadoras.

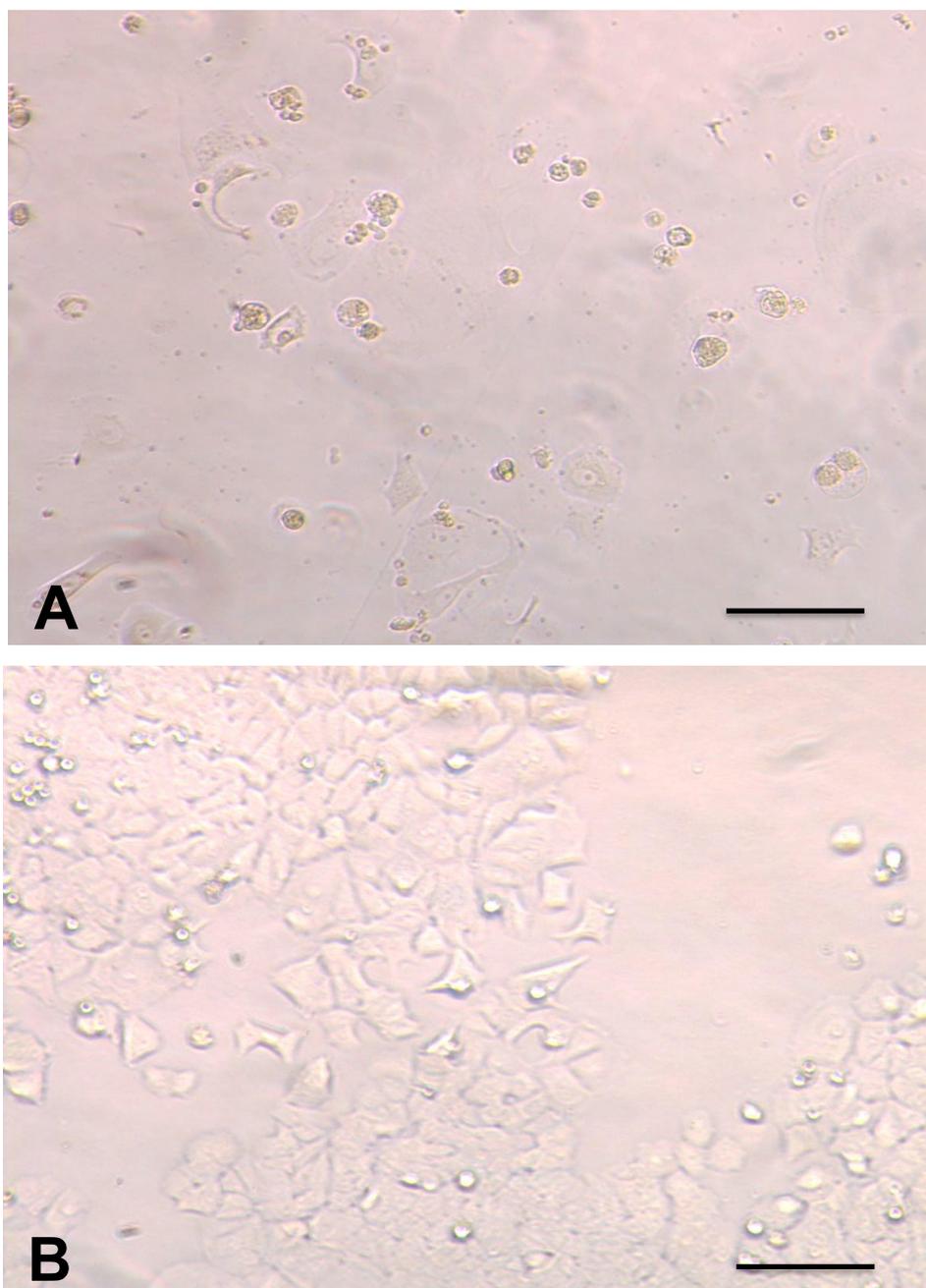


Figura 1 – Proliferação de células MCF7 carregadoras e ativas em 10 dias.

As células estão em cultura no meio DMEM, 10 dias após semeadura inicial em 3000 células/centímetro quadrado (cm^2). Na figura 1A, observam-se células da alíquota carregadora, que foram irradiadas com 100 Gy previamente à semeadura. Na figura 1B, observam-se células da alíquota ativa, não irradiadas. As células ativas apresentam padrão de crescimento habitual para a linhagem celular, enquanto as células carregadoras exibem importante redução de seu potencial proliferativo, sustentando a hipótese de que nos xenoenxertos não interfeririam no crescimento tumoral por parte das células ativas. Barras de escala representam 200 μm .

As células ativas foram submetidas à coloração com 4',6- diamidino-2-fenilindol (DAPI), marcador fluorescente de DNA, a fim de evidenciar células apoptóticas e garantir que apenas células viáveis fossem utilizadas para o xenoinxerto. As células com viabilidade confirmada foram distribuídas por meio de um citômetro de fluxo em doses de 1000 células por poço em duas placas de 96 poços contendo 10.000 células carregadoras por poço.

A distribuição de células nas placas de poços foi feita pelo citômetro Moflo Astrios (Beckman Coulter® Indianápolis, IN, EUA). Foram utilizados *lasers* de 488 nanômetros (nm) e 405 nm. O laser de 488nm permitiu a obtenção de dois parâmetros: a dispersão anterior (*forward scatter* - FSC) e, por meio desta, inferiu-se a complexidade interna das partículas; e a dispersão lateral (*side scatter* - SSC), por meio da qual se inferiu o tamanho das partículas. O *laser* de 405 nm, por sua vez, foi utilizado para excitação de DAPI. A sequência de análise e definição de portões foi: área de SSC x largura de SSC para distinção entre células individuais e aglomeradas; FSC x DAPI para distinção entre células viáveis e não viáveis; FSC x SSC para distinção entre células e debris. Apenas células que satisfizessem os critérios das três áreas definidas pelos portões citados eram distribuídas nas placas. A lógica de distribuição está ilustrada na Figura 2. As células foram distribuídas utilizando-se ponta de 100 micrômetros (μm) a uma pressão de 2,02 quilogramas-força/cm². O aparelho foi calibrado para menos de 1000 eventos por segundo.

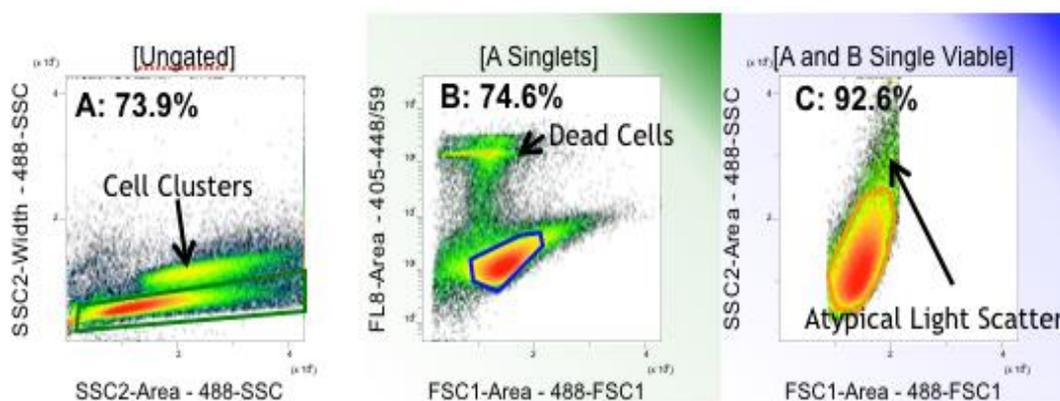


Figura 2 – Lógica de distribuição das células ativas MCF7 em placas de poço para o xenoenxerto.

Da esquerda para a direita: células individuais (73,9% do total de eventos) foram discriminadas de aglomerados celulares (A); exclusão de células apoptóticas por DAPI foi utilizada como critério de viabilidade celular (74,6% dos eventos selecionados na etapa anterior mostraram-se células viáveis - B); o produto final da distribuição celular inclui apenas células individuais, viáveis e com dispersão de luz típica (92,6% dos eventos selecionados na etapa anterior - C).

A cada poço foi acrescentado o volume de 25 microlitros (μl) de Matrigel[®] (Corning[®], Tewksbury, MA, EUA), uma matriz protéica secretada por células de sarcoma de camundongos Engelbreth-Holm-Swarm, produzida e comercializada para uso como arcabouço em culturas e experimentos envolvendo células.

O volume final de cada poço contendo células ativas, células carregadoras e Matrigel[®] era de 50 μl . As placas contendo esse preparado final foram mantidas sob refrigeração a 4°C até o momento exato da injeção dos xenoenxertos.

Todo o procedimento com os animais foi realizado em cabines de biossegurança classe II. Os animais foram anestesiados com isoflurano 3% em aparelho vaporizador para roedores e o oxigênio foi fornecido aos animais na razão de 1:1, em relação ao anestésico, durante todo o procedimento. A antisepsia foi feita com etanol 70% em área compreendida

entre as regiões cervical e inguinal dos sujeitos. O conteúdo de cada poço foi aspirado em seringa de 0,5 ml acoplada permanentemente a uma agulha de 28 Gauge (*1/2 mL BD Lo-Dose[®] U-100 insulin syringe with 28 Gauge x 1/2 inche*, Becton Dickinson[®], Franklin Lakes, NJ, EUA) e injetado em sítios anatômicos consistentes com a localização das glândulas mamárias dos animais (conforme esquema na Figura 3), sendo quatro sítios por animal (superior direito, superior esquerdo, inferior direito, inferior esquerdo), conforme ilustra a Figura 4.

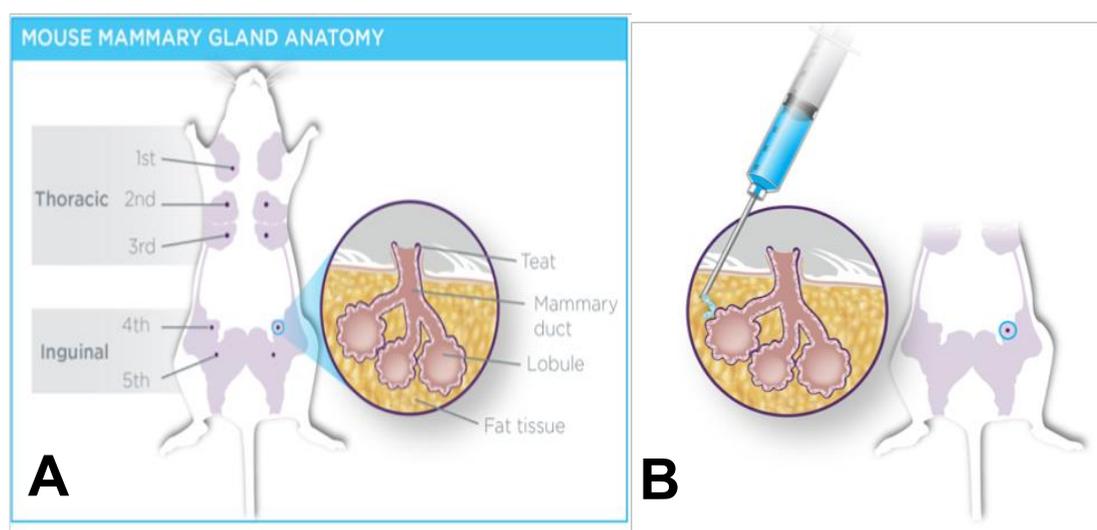


Figura 3: Esquema ilustrativo de injeção em glândulas mamárias das camundongo-fêmeas.

Na figura 3A, uma ilustra-se a distribuição em pares das glândulas mamárias na porção ventral do corpo do animal e, em detalhe, a estrutura microscópica da glândula e do sistema lactífero. Na figura 3B, ilustra-se uma injeção realizada na glândula mamária de um animal.

Fonte: aegiscreative.com, acesso em 20/02/2018.

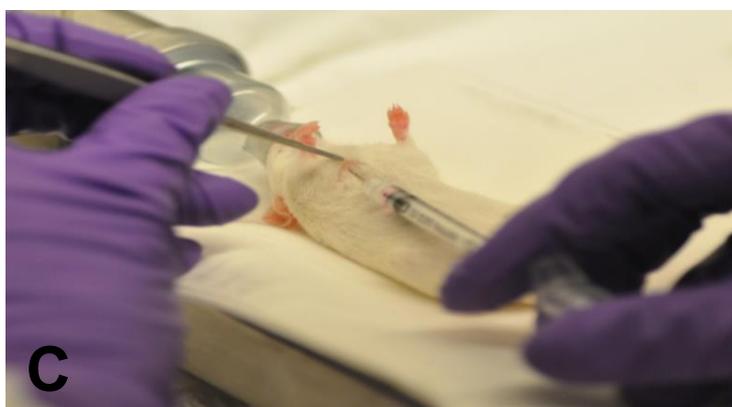
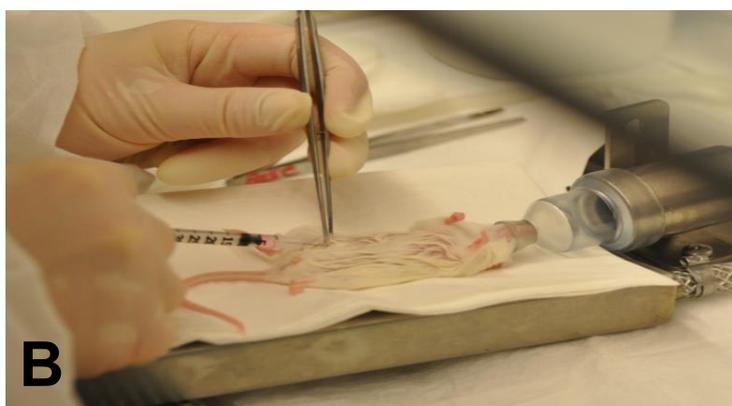


Figura 4 – Procedimento de xenoenxerto de células MCF7 em glândulas mamárias das camundongos-fêmea.

Na figura 4A, animal submetido à anestesia inalatória e antissepsia com etanol 70% em tronco anterior e abdome; na figura 4B, injeção de xenoenxerto em sítio inferior direito; e na figura 4C, xenoenxerto em sítio superior direito.

Após a injeção dos xenoenxertos os animais receberam uma dose subcutânea de cetoprofeno de cinco miligramas/quilograma. Foram observados atentamente por 72 horas para detecção de sinais de dor ou desconforto como redução de atividade, do apetite ou da ingestão hídrica; posição de defesa; automutilações; aumento de agressividade ou vocalizações; aversão aos companheiros de gaiola; piloereção; postura arqueada; descarga nasal ou ocular; permanência longa em posição deitada. Caso tais sintomas fossem observados, a dose de cetoprofeno seria repetida a cada 12 horas até remissão dos mesmos. No entanto, nenhum animal apresentou tal sintomatologia após qualquer intervenção realizada neste estudo. O procedimento de xenoenxerto ocorreu sem intercorrências.

Os animais foram acompanhados a partir de então semanalmente para avaliação de condições gerais de saúde e crescimento de tumores. O tamanho tumoral foi aferido por palpação local por único observador e medida com paquímetro digital quando atingiam tamanho palpável. Conforme normas de cuidados com os animais no referido biotério, em caso de tumores maiores que dois centímetros (cm), considerados capazes de gerar sofrimento e limitar o sujeito em suas atividades básicas, o animal portador deveria ser sacrificado. No entanto, isso não ocorreu com nenhum dos sujeitos do presente estudo. A ficha de seguimento semanal de cada animal está demonstrada no Apêndice 4.

4.5. Intervenção com injeção de solução salina ou enxerto de gordura

Duas semanas após o xenoenxerto, os animais foram submetidos à segunda intervenção e, para tal, foram divididos em dois grupos: grupo Salina (injeção de solução estéril de cloreto de sódio a 0,9%) e grupo Lipo

(injeção de enxerto gorduroso humano). Ambos os grupos continham 20 indivíduos e tiveram os animais submetidos à anestesia e antissepsia conforme descrito acima para o xenoenxerto.

O grupo Salina recebeu em cada sítio previamente injetado com células tumorais uma nova injeção de 100 µl de solução estéril de cloreto de sódio a 0,9% por meio de cânula romba 16 G Monoject® (Covidien®, Minneapolis, MN, EUA). A injeção com cânula romba era precedida por uma perfuração única e à distância para cada sítio por agulha de 16 G, determinando um orifício e um pertuito em direção à glândula mamária por onde a cânula romba foi inserida. Os orifícios de inserção da cânula tiveram suas bordas aproximadas por pinças cirúrgicas e seladas com Vetbond® (3M®, Saint Paul, MN, EUA), conforme a Figura 5.

No grupo Lipo, o procedimento ocorreu da mesma forma do grupo Salina, exceto que o conteúdo da injeção era 100 µl de enxerto gorduroso preparado a partir de lipoaspirado humano, conforme a técnica de Coleman, (COLEMAN, 1995). O material foi obtido por meio de isenção concedida pelo *Institutional Review Board* da Universidade de Pittsburgh (IRB número 0511186 – Apêndice 5) para coleta de materiais de descarte cirúrgico sem identificação da paciente doadora. Apenas a idade de 57 anos e índice de massa corpórea de 28 kg/metro quadrado (m²) eram conhecidos e coincidentes com o perfil demográfico geral de pacientes portadoras de neoplasia mamária. O lipoaspirado foi coletado de tecido subcutâneo abdominal por meio de lipoaspiração com cânula romba 3 milímetros (mm) de diâmetro, com 3 orifícios distais e inferiores, acoplada a seringas de 10ml, cujos êmbolos foram tracionados gerando vácuo utilizado para aspiração da gordura. As seringas tiveram os êmbolos removidos e foram seladas com tampas e filme estéril e centrifugadas a 1286 gravidades (g) por 3 minutos.

Foram descartadas as frações líquida e oleosa. Com um transferidor, o conteúdo de gordura foi distribuído em seringas de 01 ml Luer-Lok® (Becton Dickinson®, Franklin Lakes, NJ, EUA). Toda a manipulação da gordura foi realizada sob condições estéreis em cabines de biossegurança classe II.

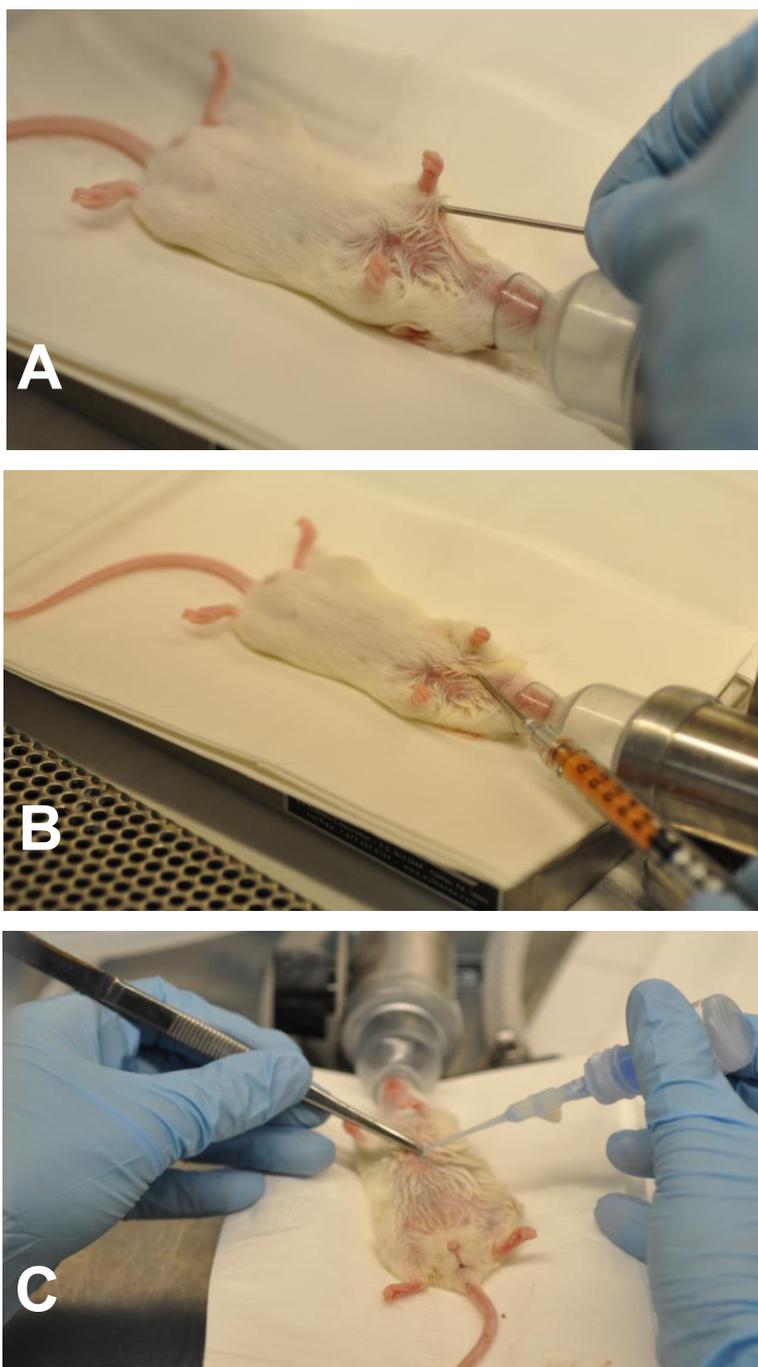


Figura 5 – Procedimento de lipoenxertia em glândulas mamárias das camundongos-fêmea.

Na figura 5A, confecção de perfuração única remota com agulha 16 G para lipoenxertia de sítios superiores. Na figura 5B, injeção de enxerto gorduroso em sítio superior direito por meio de cânula 16 G introduzida em pertuito formado pela perfuração com agulha descrita acima. Na figura 5C, aproximação de bordas cutâneas com pinça anatômica e aplicação de cola de tecidos sintética para síntese das perfurações.

A partir de então, o seguimento semanal prosseguiu sob a mesma rotina descrita acima por um período total de oito semanas a partir do xenoenxerto.

4.6. Morte indolor induzida dos animais e avaliação geral dos tumores, enxertos gordurosos e órgãos-sede de metástases

Após oito semanas de seguimento, a morte indolor induzida foi realizada primariamente em câmara de dióxido de carbono e secundariamente por deslocamento cervical. O ato evoluiu sem intercorrências para todos os sujeitos.

Cada animal foi submetido à necropsia imediata e foram dissecados os tumores, os enxertos gordurosos (para os animais do grupo Lipo), o fígado, o baço e os pulmões.

Tumores e enxertos gordurosos foram medidos com régua milimetrada, pesados em balança de precisão (Sartorius Weighing Technology[®], Goettingen, Alemanha) e tiveram seus volumes aferidos por meio de Picnômetro (AccuPyc[®] II 1340, Micrometrics, Norcross, GA, EUA). Todas as amostras foram prontamente fixadas em formalina 10% e identificadas por etiqueta codificada.

Os fígados, baços e pulmões coletados foram avaliados macroscopicamente para evidências de tumores.

A documentação fotográfica da necropsia incluiu a identificação dos animais e o aspecto *in situ* e após dissecação dos tumores e enxertos gordurosos.

4.7. Avaliação histológica de tumores, enxertos gordurosos e órgãos-sede de metástases

As amostras permaneceram fixadas em formalina a 10% por sete dias e foram processadas e embebidas em parafina para a confecção de lâminas e análise histológica.

Cada amostra de tumor teve lâminas submetidas à coloração por hematoxilina e eosina (HE) e imunohistoquímica para Ki67. Materiais de histologia são da marca Dako[®] (Carpinteria, CA, EUA), exceto se especificada outra procedência.

Brevemente, para coloração de HE, as amostras foram desparafinizadas em xileno e reidratadas em etanol em concentração regressiva (100%, 95% e 70%) conforme protocolo-padrão de histologia. Em seguida, foram incubadas em hematoxilina de Weighers por 10 minutos. Foram diferenciadas numa solução alcoólica de ácido clorídrico por um minuto, incubadas em *Scott's tap water* por dois minutos e em solução alcoólica de eosina por dois minutos. Os cortes histológicos foram desidratados em etanol com concentrações progressivas (70%, 95% e 100%), seguidas de imersão em xileno e as lâminas foram montadas com Permount[®] (ThermoFisher Scientific[®], Grand Island, NY, EUA). Seguiu-se secagem por 12 horas.

Para coloração de imunohistoquímica de Ki67 humano, brevemente, as lâminas foram desparafinizadas em xileno e reidratadas em etanol conforme protocolo-padrão de histologia. A recuperação antigênica foi feita com uma solução de pH 6,2 do tipo Diva Decloaker[®] (Biocare Medical[®], Concord, CA, EUA) em uma Decloaking chamber[®], a 120°C. As lâminas foram coradas no Autostainer plus[®] com solução tampão salina de 2-Amino-

2-(hidroximetil) propano-1,3-diol (tris) e solução surfactante de polisorbato 20. O anticorpo primário murino anti-ki67 humano Clone MIB-1 foi aplicado utilizando a diluição 1:100. O anticorpo secundário consistia no Envision Dual Link[®] associado a polímero de peroxidase de rabanete (*horseradish peroxidase - HPR*). O substrato foi o 3,3-diaminobenzidina, gerando marcação em cor marrom. Finalmente as lâminas foram coradas para contraste de fundo com hematoxilina, desidratadas e montadas com Permout.

As lâminas de enxertos de gordura foram coradas para HE e perilipina. Para coloração de HE, foi seguido o mesmo protocolo descrito para as amostras de tumores.

Para coloração com perilipina, as lâminas foram desparafinizadas em xileno e reidratadas em etanol conforme protocolo-padrão de histologia. Recuperação antigênica foi feita com solução tampão e citrato pH 6 a 100°C. As lâminas foram lavadas com solução tampão salina de tris e solução surfactante de polisorbato 20. Em seguida, o corante Sudan Black B foi aplicado. O anticorpo primário utilizado era policlonal de porquinho-da-índia anti-humano para perilipina PLIN1, localizada na superfície de gotículas de gordura intracelulares dos adipócitos (Progen[®], Heidelberg, Alemanha) e foi usado na diluição 1:50. O anticorpo secundário consistia em um conjugado com tetrametilrodamina (corante fluorescente de cor laranja) anti-porquinho-da-índia, numa diluição de 1:100. O substrato foi o 3,3-diaminobenzidina, gerando marcação em cor marrom. Finalmente as lâminas foram coradas para contraste de fundo com DAPI, desidratadas e montadas com meio de montagem fluorescente.

As amostras de fígado, baço e pulmões foram coradas em HE conforme protocolo descrito para amostras de tumores.

A análise histológica foi feita por um patologista “cego” e especialista em patologia da mama, considerando a identificação dos tumores, grau histológico de BLOOM & RICHARDSON (1957), modificado por ELSTON & ELLIS (1991), e percentual de positividade de Ki67 dos tumores; e presença de metástases em baço, fígado e pulmões.

O score de BLOOM & RICHARDSON (1957) modificado por ELSTON & ELLIS (1991) é uma medida de grau histológico da neoplasia mamária e do seu potencial de agressividade. São analisados três aspectos e cada um deles é pontuado de um a três: diferenciação (capacidade de formar glândula mamária), pleomorfismo nuclear e atividade mitótica. O score varia de três a nove e corresponde aos seguintes graus histológicos: score de três a cinco, grau um; scores de seis e sete, grau dois; score de oito e nove, grau três.

O índice proliferativo dos tumores foi avaliado pela proporção de células positivas para ki67 em relação ao total de células; e é expressa em porcentagem. A proteína Ki67 é um marcador direto de proliferação celular, sendo expressa em todas as fases ativas do ciclo celular e não expressa na fase de repouso.

As amostras de enxertos gordurosos foram analisadas pelos próprios pesquisadores quanto à integridade da arquitetura tecidual adiposa como preditor de viabilidade.

4.8. Análise estatística

Os dados de volume e massa tumoral e os índices de positividade do Ki67 foram comparados entre os grupos pelo teste T de Student, sendo que

os valores de volume e massa sofreram transformação logarítmica para satisfazer o critério de distribuição normal. A aferição de normalidade foi feita pelo teste de Shapiro-Wilks.

A velocidade de surgimento e crescimento tumoral foi comparada entre os grupos por meio de análise de sobrevivência de Kaplan-Meier e teste de Mantel. A presença de invasão macroscópica foi comparada pelo teste de Qui-quadrado com probabilidade de Yates. E o grau histológico foi comparado por meio do teste de Mann-Whitney.

Todos os testes tiveram nível de significância estabelecido em $p < 0,05$ e foram realizados nos programas SYSTAT 13.1 (Systat Software Inc, Chicago, IL, EUA) e SPSS, versão 20 (IBM, Armonk, NY, EUA).

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1. Acompanhamento dos animais

Após o procedimento de intervenção com injeção de lipoaspirado humano, um dos animais do grupo Lipo, evoluiu em 72 horas com hipotermia e hipoatividade culminando em óbito. Nenhuma causa associada ao procedimento ou a qualquer etapa do protocolo de pesquisa foi identificada para a perda do animal. A partir de então, o seguimento semanal prosseguiu sob a mesma rotina e sem demais intercorrências.

5.2. Prevalência e crescimento tumoral

Não houve diferença entre os grupos quanto ao surgimento de tumores palpáveis ou à velocidade de crescimento tumoral. Os dados são expressos por meio de análise de sobrevivência de Kaplan-Meier em termos de sítios livres de tumores (Figuras 6, 7 e 8).

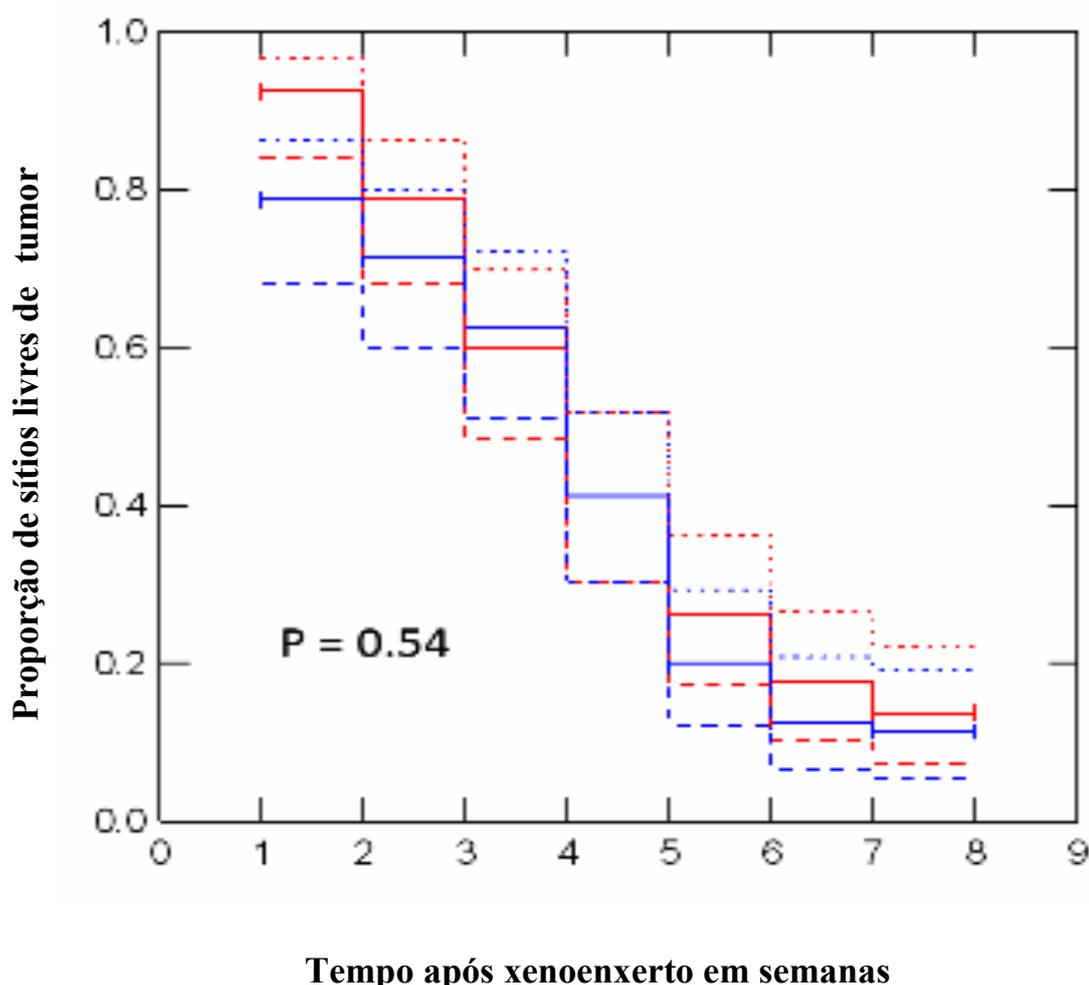


Figura 6 – Análise de sobrevivência de Kaplan-Meier para surgimento de tumores em sítios submetidos ao xenoenxerto.

Expressa-se a queda da proporção de sítios livres de tumor (no eixo y) em função do tempo em semanas (no eixo x) para o grupo Salina (curva azul) e Lipo (curva vermelha). Linhas pontilhadas representam os intervalos de confiança. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos quanto ao tempo de surgimento de tumores palpáveis ($p=0,54$; teste de Mantel).

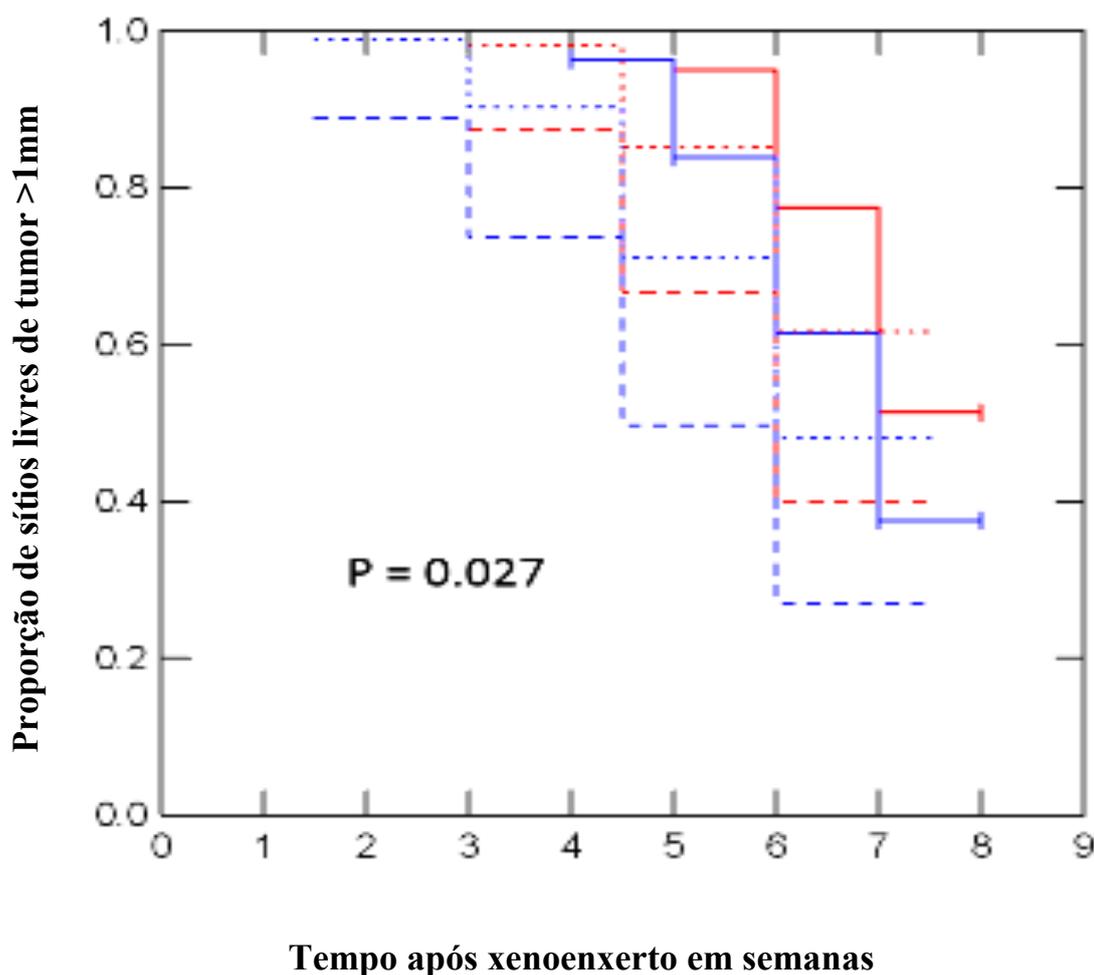


Figura 7 – Análise de sobrevida de Kaplan-Meier para surgimento de tumores maiores que 1 mm em sítios submetidos ao xenoenxerto.

Expressa-se a queda da proporção de sítios livres de tumor maior que 1 mm (no eixo y) em função do tempo em semanas (no eixo x) para o grupo Salina (curva azul) e Lipo (curva vermelha). Linhas pontilhadas representam os intervalos de confiança. Houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos quanto ao tempo de surgimento de tumores maiores que um mm, sendo esses mais precoces no grupo Salina ($p=0,027$; teste de Mantel). No entanto, ao final do seguimento, observa-se que o número de tumores maiores que um mm não é estatisticamente diferente entre os grupos. Assim, parece ter havido um retardo temporário no crescimento tumoral para essa faixa de tamanho no grupo Lipo entre a quinta e a sétima semanas, porém esse atraso foi revertido até o fim do seguimento em 8 semanas.

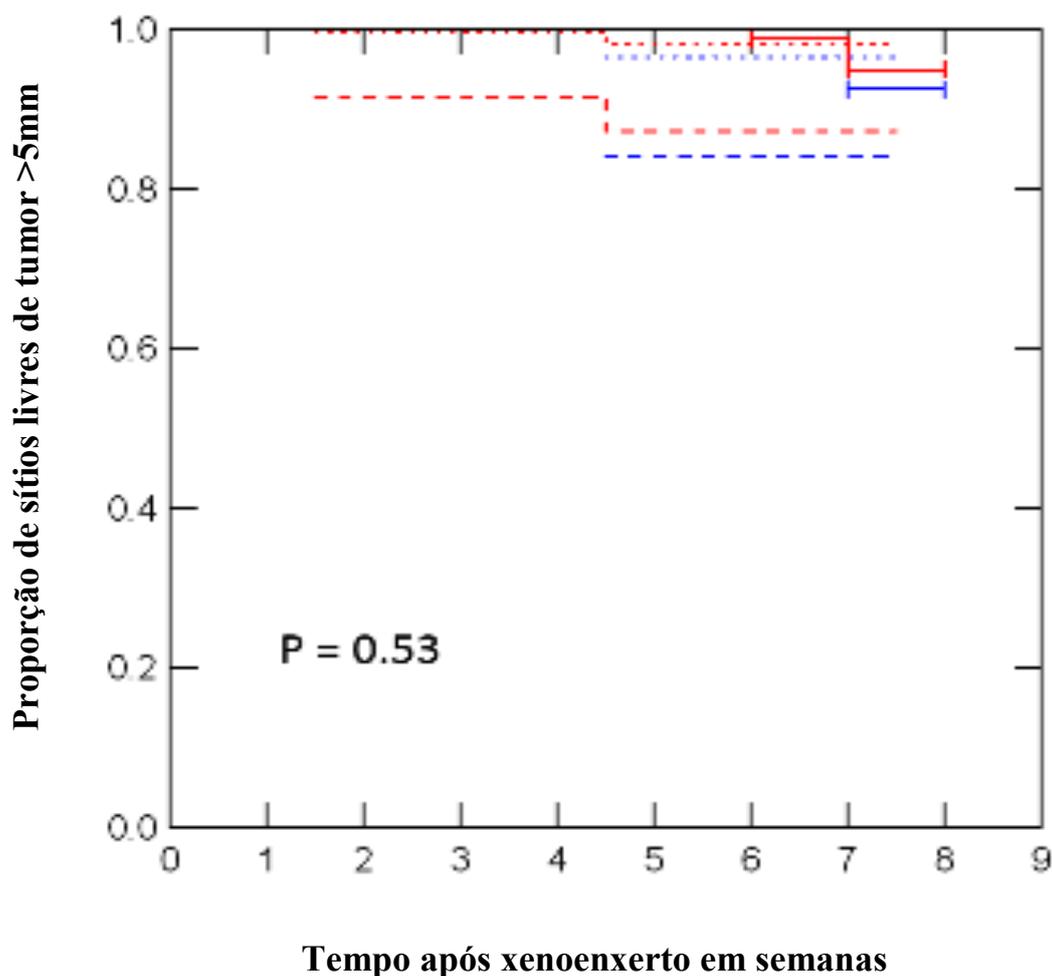


Figura 8 – Análise de sobrevida de Kaplan-Meier para surgimento de tumores maiores que 5 mm em sítios submetidos ao xenoenxerto.

Expressa-se a queda da proporção de sítios livres de tumor maior que 5mm (no eixo y) em função do tempo em semanas (no eixo x) para o grupo Salina (curva azul) e Lipo (curva vermelha). Linhas pontilhadas representam os intervalos de confiança. Não houve diferença estatisticamente significante entre os grupos quanto ao tempo de surgimento de tumores maiores que cinco mm ($p=0,53$; teste de Mantel).

Ao final do seguimento em oito semanas, tumores papáveis eram detectados em 86,25% dos sítios submetidos aos xenoenxertos no grupo Salina e em 85,53% dos sítios do grupo Lipo.

Durante a necropsia, todos os sítios de glândulas mamárias previamente injetados com células MCF7 apresentavam tumores macroscópicos. O aspecto macroscópico de tumores *in situ* está ilustrado na Figura 9.

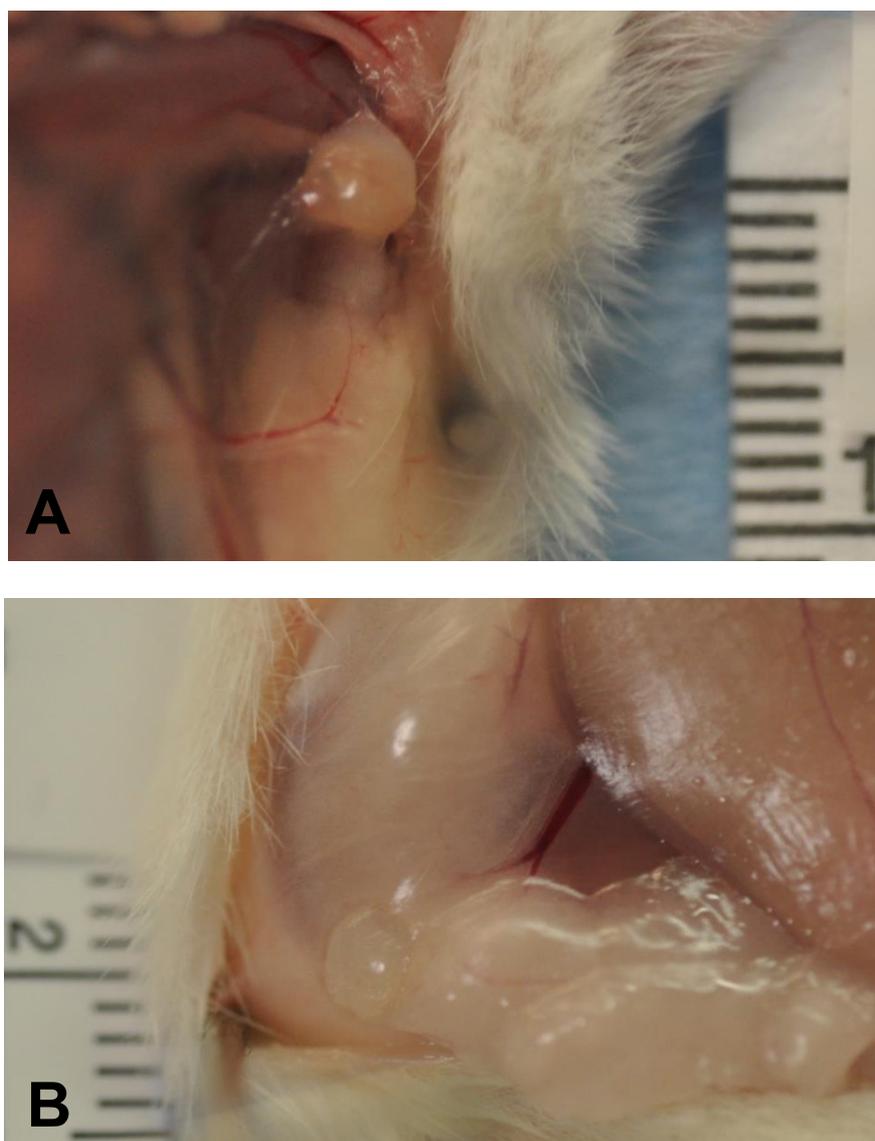


Figura 9 – Aspecto macroscópico *in situ* dos tumores obtidos por meio dos xenoenxertos.

Na figura 9A, tumor em glândula mamária superior esquerda; na figura 9B, tumor em glândula mamária inferior D. Observa-se a contigüidade do tumor em relação ao tecido mamário. Referência de tamanho por meio de régua milimetrada em ambas as fotos.

5.3. Volume e massa tumoral

O tamanho máximo dos tumores foi de 0,49 centímetros cúbicos (cm³), o que não causou desconforto significativo e não determinou necessidade de eutanásia precoce, requerida em casos de tumores maiores que dois cm.

O volume e a massa dos tumores foram significativamente menores no grupo Lipo comparados ao grupo Salina ($p=0,046$ e $p=0,038$, respectivamente), demonstrado nas Figuras 10 e 11.

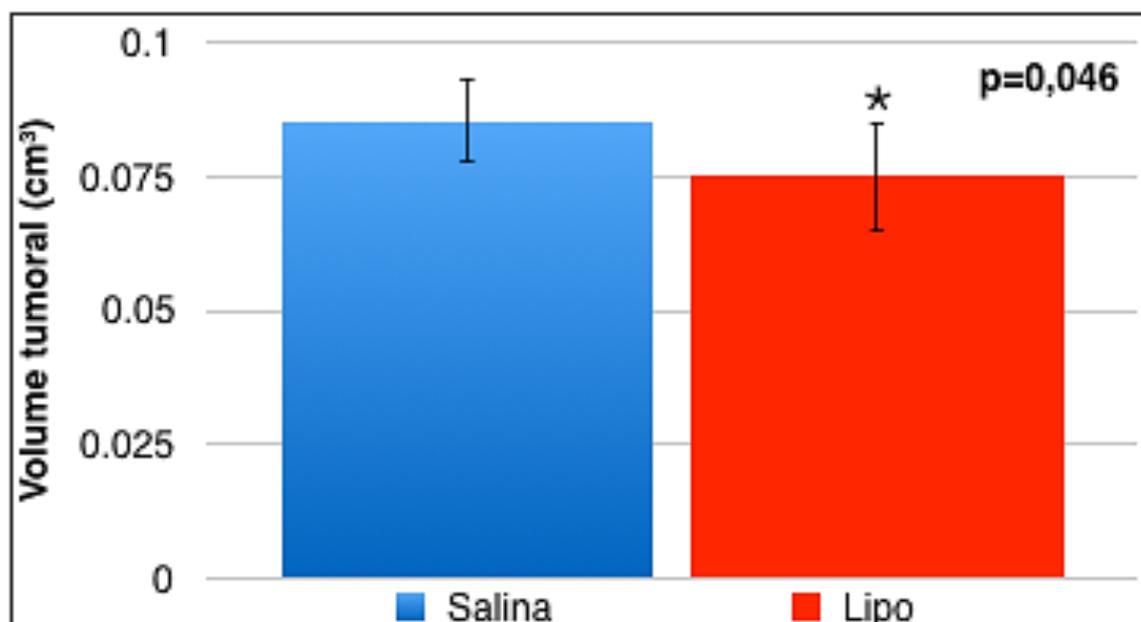


Figura 10 – Representação da média de volumes tumorais em centímetros cúbicos medidos por picnômetro.

O grupo Lipo apresentou uma média de volume tumoral significativamente menor que o grupo Salina ao final do seguimento de oito semanas. $p=0,046$, teste T de Student. Barras de erro representam erro-padrão. * Destaca significância estatística.

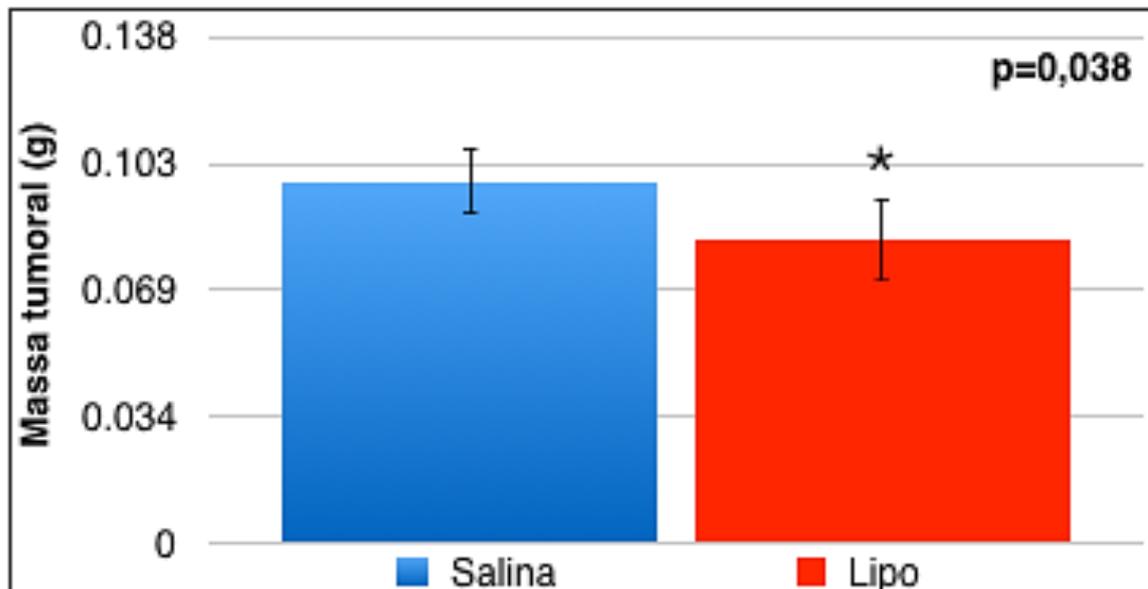


Figura 11 – Representação da média de massas tumorais em gramas medidas por balança de alta precisão.

O grupo Lipo apresentou uma média de massa tumoral significativamente menor que o grupo Salina ao final do seguimento de oito semanas. $p=0,038$, teste T de Student. Barras de erro representam erro-padrão. * Destaca significância estatística.

5.4. Grau histológico

Cada amostra de tumor teve lâminas coradas por HE e recebeu um escore de grau histológico conforme os critérios de BLOOM & RICHARDSON (1957) modificado por ELSTON & ELLIS (1991). A Figura 12 demonstra exemplos de lâminas de tumores do grupo Salina e Lipo por meio das quais foi analisado o grau histológico dos tumores.

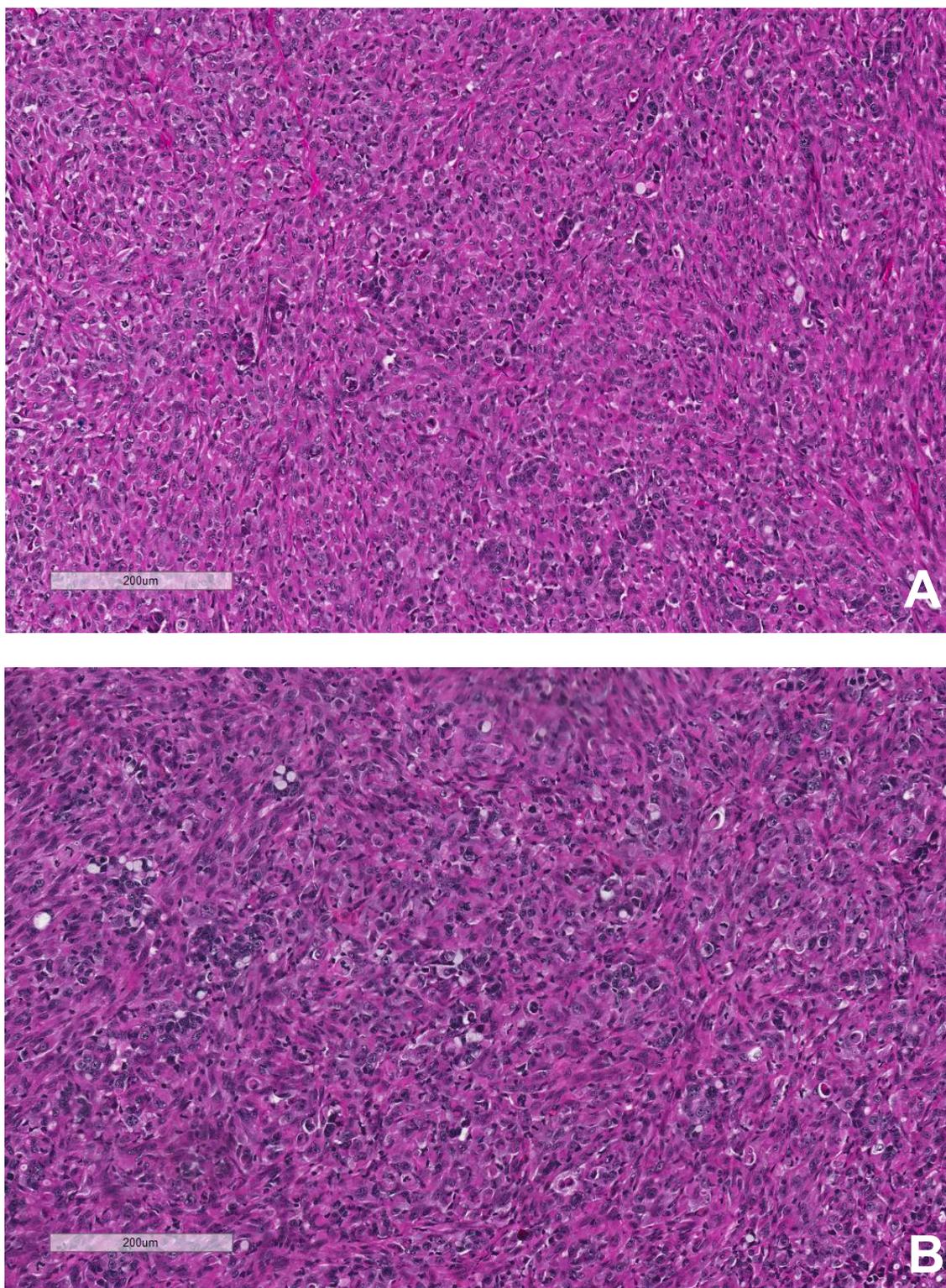


Figura 12 – Amostras de tumores corados em hematoxilina e eosina para determinação do grau histológico.

Na figura 12A, ilustra-se amostra do grupo Salina e na figura 12B, do grupo Lipo. A barra de escala corresponde a 200 μm .

Não houve diferença entre os grupos quanto aos escores de grau histológico dos tumores ($p=0,17$), conforme ilustrado na Figura 13.

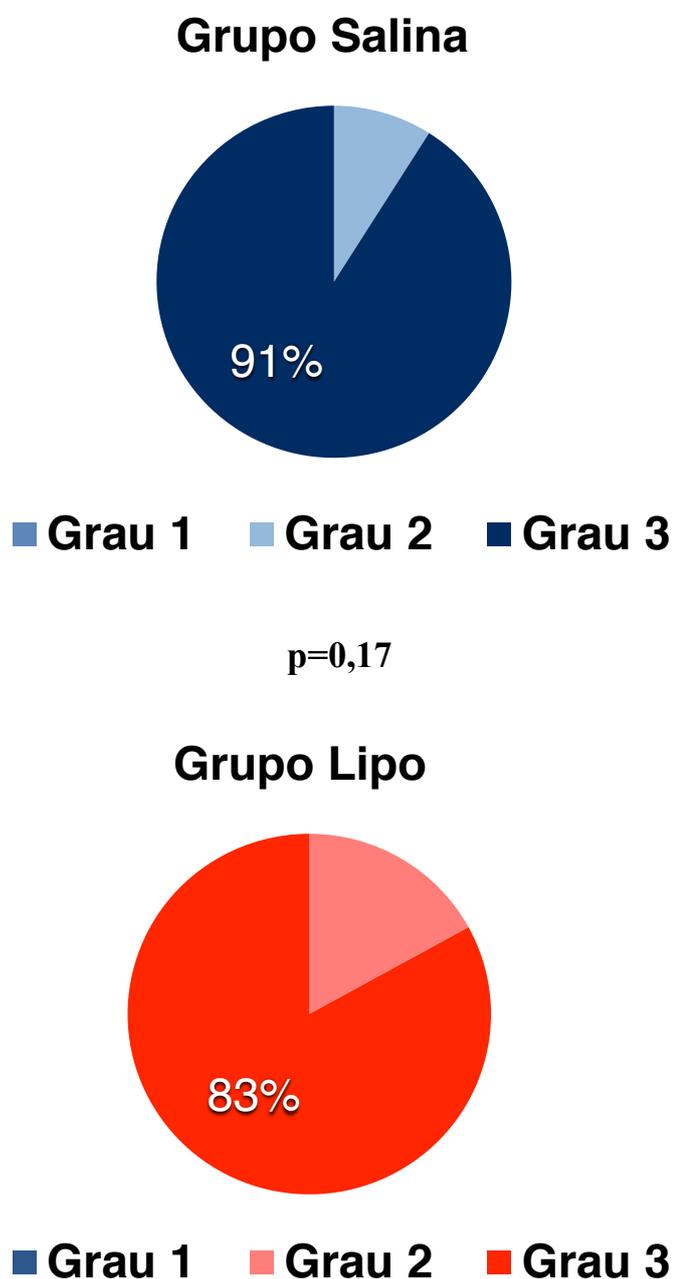


Figura 13 – Distribuição percentual de tumores dos grupos Salina e Lipo conforme o grau histológico.
A comparação entre os grupos demonstrou não haver diferença estatisticamente significativa entre eles quanto ao escore de grau histológico ($p=0,17$; teste de Mann-Whitney).

5.5. Índice proliferativo

A porcentagem de células positivas para Ki67 na imuno-histoquímica foi contada para amostras de cada tumor. A Figura 14 ilustra o exemplo de lâminas de tumores provenientes de ambos os grupos preparadas para detecção de Ki67 na imuno-histoquímica.

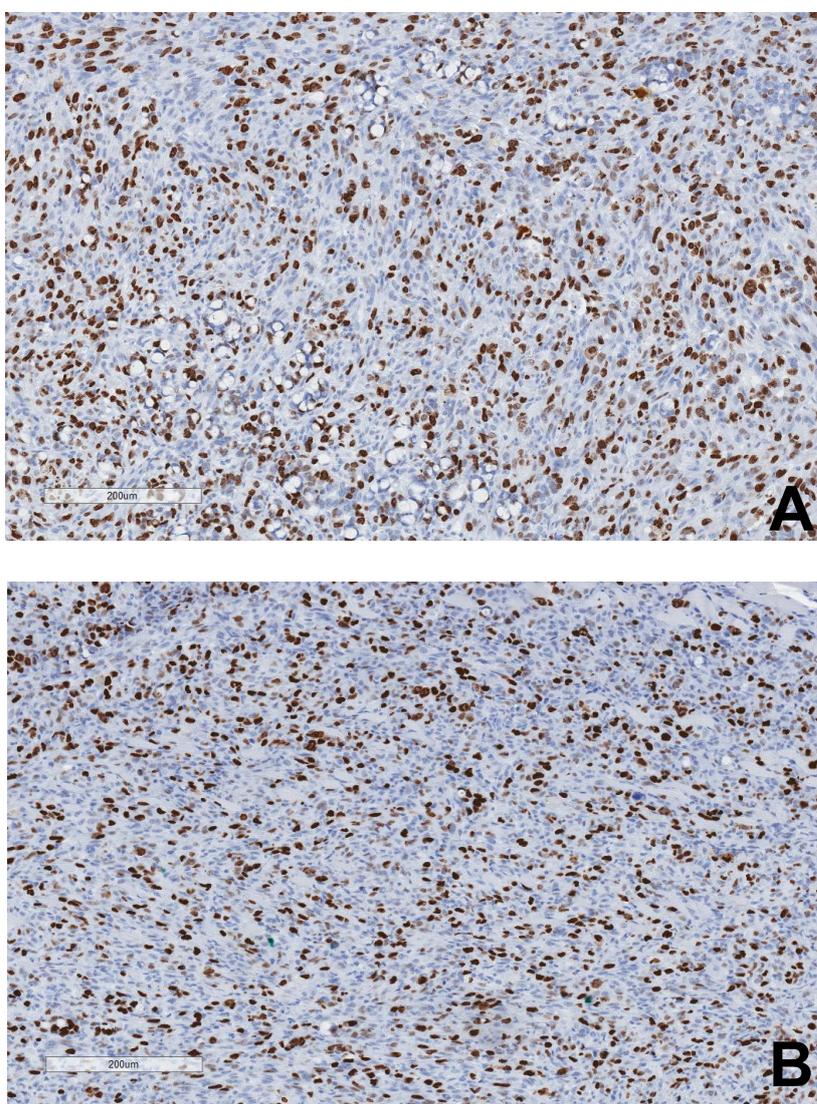


Figura 14 – Amostras de tumores submetidos a método de imuno-histoquímica para detecção de ki67.

Na figura 14A, ilustra-se amostra do grupo Salina e na figura 14B, do grupo Lipo. A barra de escala corresponde a 200 µm e as células castanhas são células positivas para Ki67, sugerindo atividade proliferativa no tumor.

O índice proliferativo dos tumores no grupo Lipo (média de 24,5%) foi significativamente menor que o do grupo Salina (27,7%), sugerindo que tumores recebedores de enxertos gordurosos em seus arredores apresentaram menor quantidade de células em fase ativa do ciclo celular em oito semanas de seguimento (Figura 15).

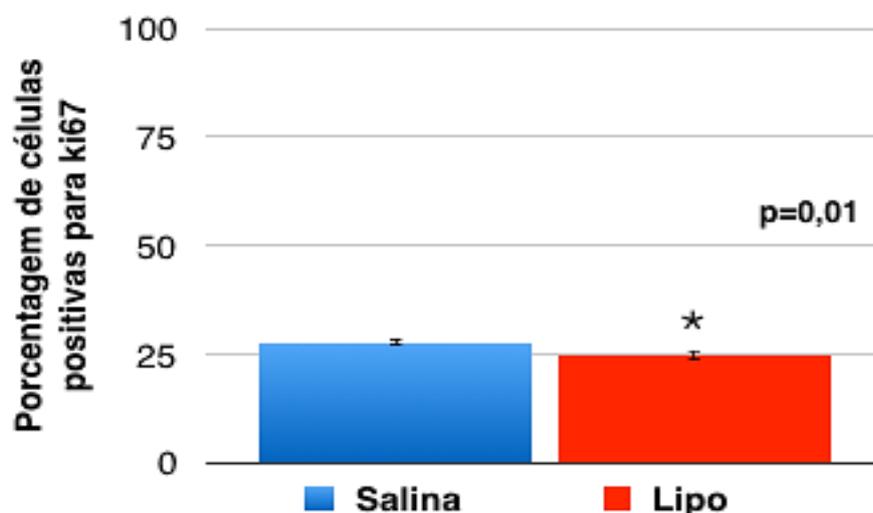


Figura 15 – Representação da média de porcentagem de células positivas para ki67.

O grupo Lipo apresentou um índice proliferativo significativamente menor que o grupo Salina ao final do seguimento de oito semanas. $p=0,01$, teste T de Student. Barras de erro representam erro-padrão. * Destaca significância estatística.

5.6. Invasão macroscópica e metástases

Invasão macroscópica foi detectada em ambos os grupos envolvendo músculo, pele ou peritônio. A incidência de invasão é expressa em termos de porcentagem do total de tumores na Tabela 1.

Foi significativamente mais freqüente a ocorrência de invasão de tecidos vizinhos no grupo Salina ($p=0,003$). A invasão muscular está ilustrada na Figura 16.

Tabela 1 – Invasão tumoral macroscópica a tecidos vizinhos.

	Salina	Lipo	p
Músculo	17,5	5,2	0.03 *
Pele	5	5,2	1
Peritônio	15	5,2	0.07
Total	37,5	15,6	0.003*

A incidência de invasão tumoral macroscópica de tecidos vizinhos é expressa pela porcentagem de tumores invasores em relação ao total de tumores por grupo. A comparação foi realizada pelo teste de Qui quadrado e a invasão muscular ($p=0,03$) e total ($p=0,003$) foram significativamente menores no grupo Lipo. * Destaca significância estatística.

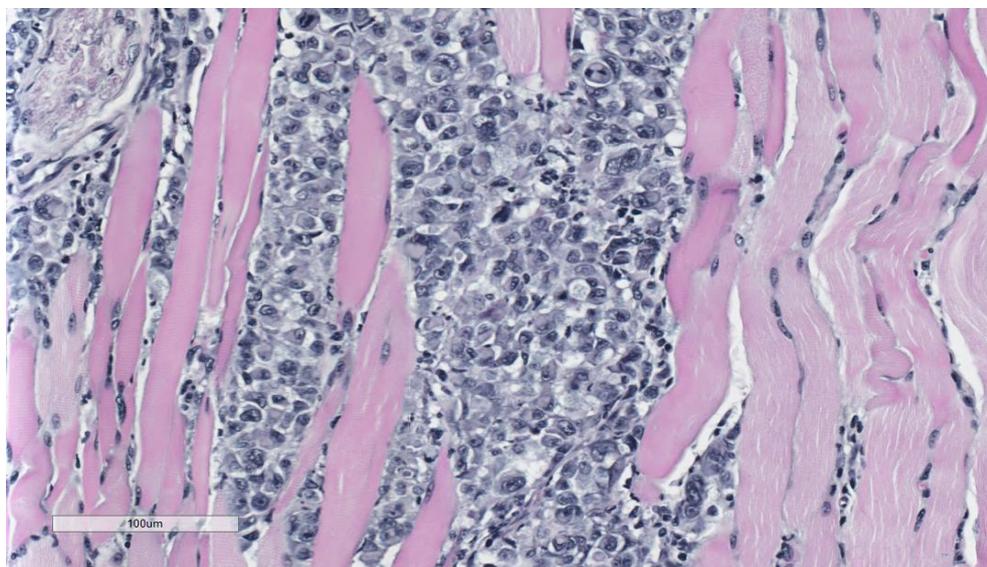


Figura 16 – Imagem de tumor do grupo Salina corado em hematoxilina e eosina demonstrando invasão do tecido muscular adjacente. Barra de escala representa 100 μ m.

Não foram encontradas linfonomegalias axilares ou inguinais sugestivas de disseminação linfática dos tumores em nenhum animal.

Não foram encontradas lesões macroscópicas sugestivas de metástases no fígado, baço ou pulmões. Também na avaliação histológica não foi identificada nenhuma metástase à distância (Figura 17).

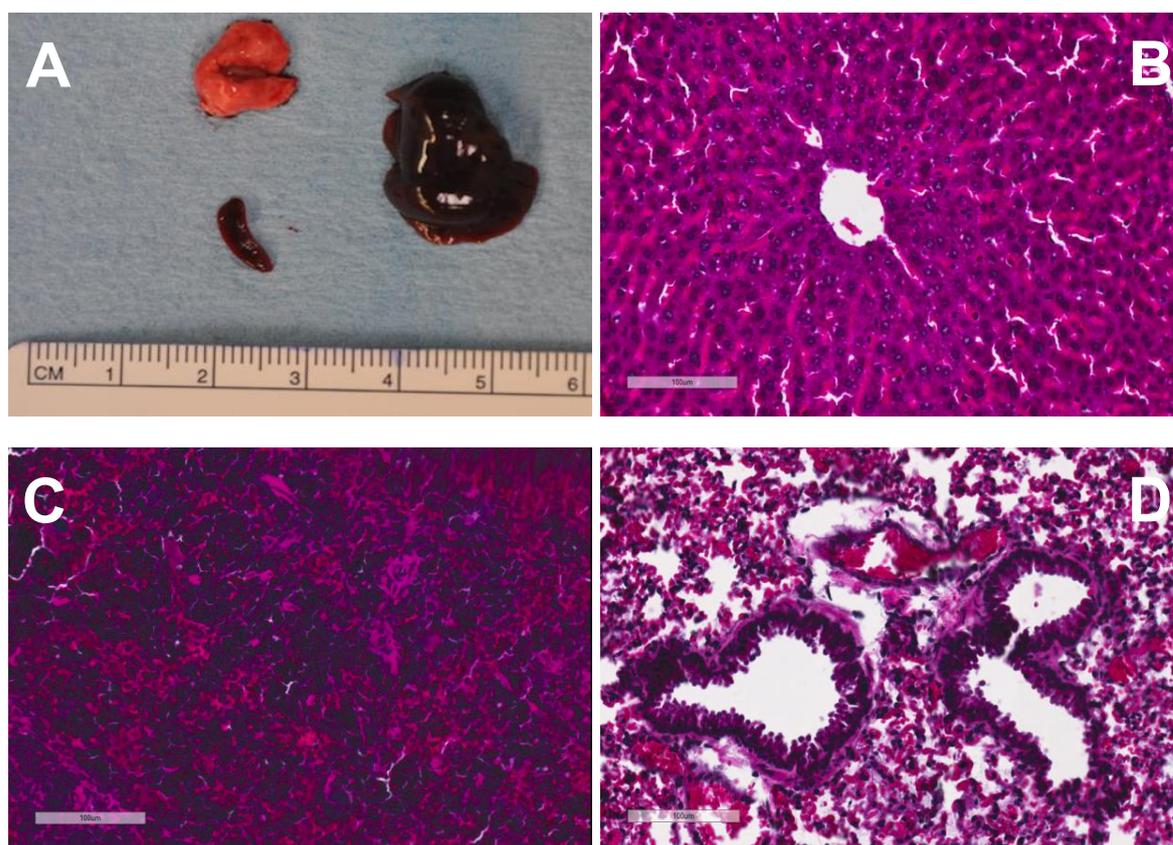


Figura 17 – Exame macroscópico e microscópico de fígado, baço e pulmões para detecção de metástases à distância.

Na figura 17A, o aspecto macroscópico dos referidos órgãos não demonstrando lesões sugestivas de metástases. A avaliação microscópica em hematoxilina e eosina demonstrou não haver metástases em fígado (ilustrado na figura 17B), baço (na figura 17C) e pulmões (na figura 17D). As barras de escala correspondem a 100 μm.

5.7. Enxertos gordurosos

Todos os animais do grupo Lipo tinham enxertos gordurosos macroscopicamente identificáveis nos sítios em que foram injetados. A retenção volumétrica média dos enxertos gordurosos foi de 62,7% (+/- 22,3%).

Todos os enxertos gordurosos estavam adjacentes aos tumores e em 43% dos casos foram considerados aderidos aos tumores, de modo que não havia plano de dissecação claro entre os mesmos (Figura 18).

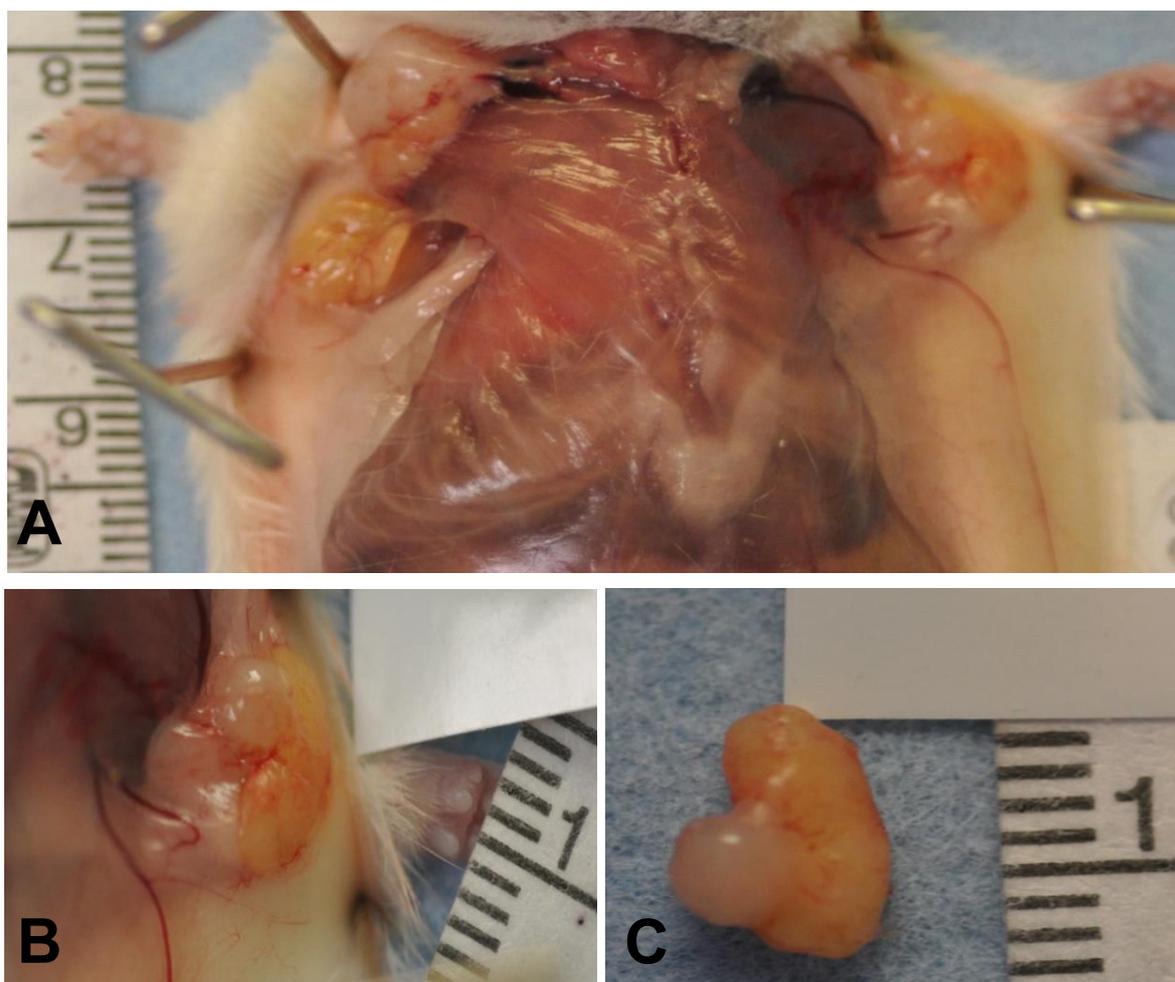


Figura 18 – Aspecto macroscópico *in situ* e após dissecação dos enxertos de gordura adjacentes aos tumores nas glândulas mamárias de camundongo-fêmea do grupo Lipo ao final do seguimento em 8 semanas.

Na figura 18A, observam-se tumores de glândulas mamárias nos sítios superiores direito e esquerdo. Na figura 18B, detalhe do tumor superior esquerdo *in situ* com enxerto de gordura contíguo. Na figura 18C, após dissecação e ressecção do conjunto tumor e enxerto de gordura, observa-se a ausência de plano de clivagem entre ambos.

As amostras de enxertos gordurosos analisadas histologicamente demonstraram manutenção da arquitetura tissular em HE e adipócitos intactos e viáveis na coloração de perilipina, que permitiu diferenciá-los dos cistos oleosos

(Figura 19). Ao final das oito semanas de seguimento, os enxertos gordurosos peritumorais estavam viáveis, vascularizados e preservados morfologicamente por meio de análise macroscópica e microscópica.

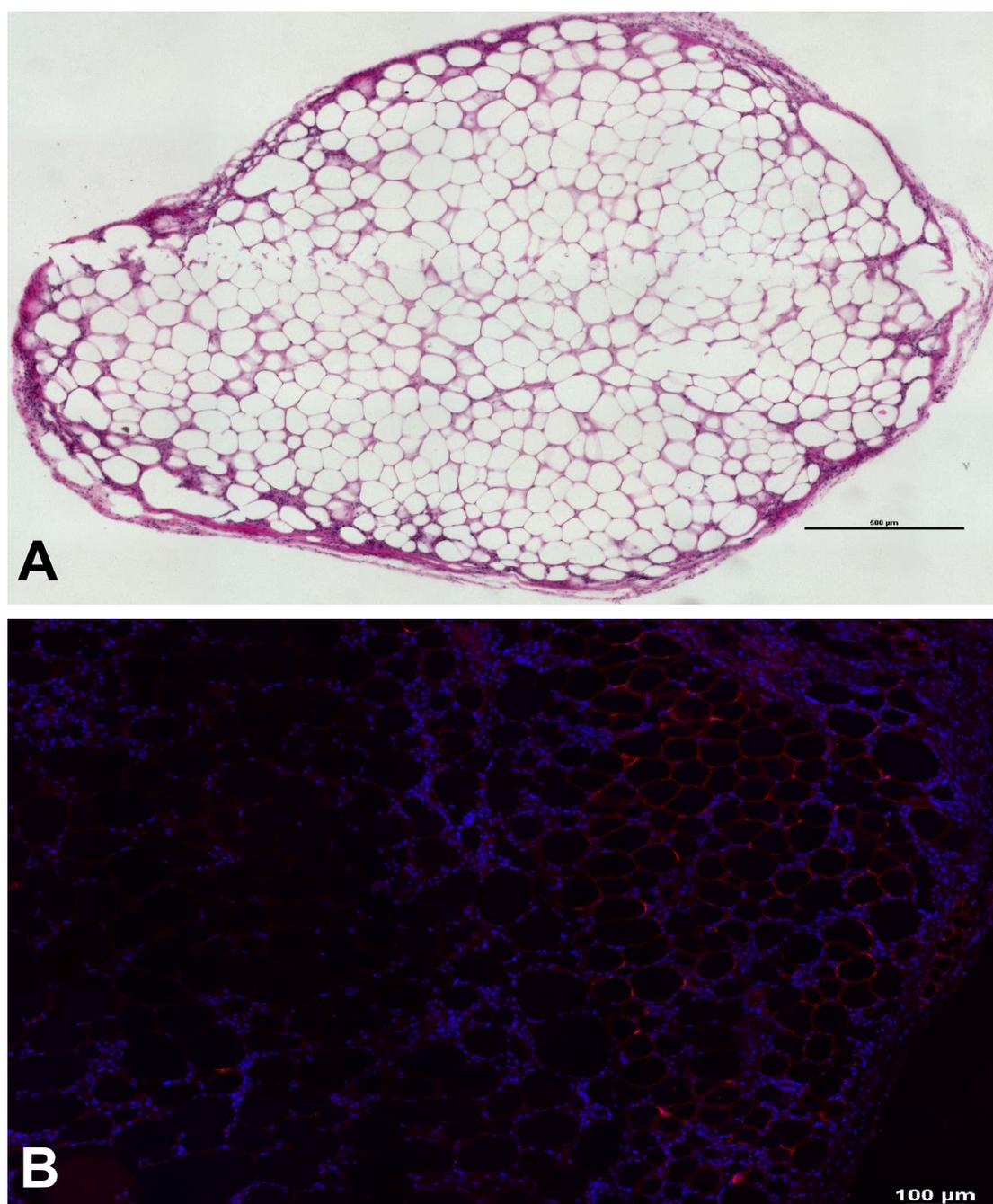


Figura 19 – Aspecto microscópico dos enxertos gordurosos.

Na figura 19A, em coloração de hematoxilina e eosina, a arquitetura tecidual mostrou-se preservada e foi possível observar vascularização habitual. Na figura 19B, a microscopia fluorescente para perilipina (corada em vermelho), demonstrou a presença de adipócitos íntegros distinguíveis de cistos oleosos. Barras de escala representam 100µm.

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

6.1. Justificativa para a necessidade de um novo modelo

O uso do enxerto de gordura para reconstrução de partes moles em Cirurgia Plástica não é um procedimento recente. Foi inicialmente descrito no século XIX por NEUBER (1893) para preenchimento de defeitos volumétricos e deformidades de contorno na face. Logo essa técnica inovadora foi introduzida como modalidade de reconstrução mamária, sendo utilizada pela primeira vez por Czerny, em 1895, que transplantou um lipoma de flanco para a reconstrução de mama pós-mastectomia (CZERNY, 1895). Desde então, vem sendo realizada em diversos sítios anatômicos. Logo surgiram curiosidades a respeito de aspectos técnicos da lipoenxertia: como seria o mecanismo de integração dos enxertos autólogos e homólogos, qual o tamanho ideal do enxerto, quanto volume é perdido, qual o papel das células hospedeiras na integração do enxerto e como ocorre a vascularização da gordura enxertada. Os primeiros resultados de enxertos em bloco foram animadores, mas logo a imprevisibilidade de reabsorção e a tendência de formação de cistos oleosos destacadas por PEER (1950) vieram a desencorajar o seu uso.

A partir da década de 80, Ilouz apresentou a lipoaspiração como método de correção de lipodistrofia sem grandes descolamentos ou ressecções cutâneas (ILLOUZ, 1983). Logo foi identificada como forma de obtenção de gordura em pequenos fragmentos e com pequena morbidade de área doadora, contribuindo para a retomada da lipoenxertia nos procedimentos reconstrutivos. E na década de 90, por meio das publicações do Dr. Coleman, foram iniciados esforços para a padronização técnica da obtenção e do preparo do enxerto gorduroso, facilitando a disseminação de seu uso e demonstrando entusiasmo com seus resultados. A chamada técnica de Coleman para preparo do enxerto de gordura consistia na

coleta de tecido adiposo com cânulas de três mm a baixa pressão, centrifugação a 3000 rpm por três minutos e enxertia em túneis com cânula romba (COLEMAN, 1995).

Nas últimas décadas, o enxerto de gordura tem se tornado um tópico emergente na Cirurgia Plástica e o seu uso na reconstrução de mama é prática corrente da maioria dos cirurgiões plásticos americanos e britânicos, como evidenciaram KLING *et al.* (2013) e SKILLMAN *et al.* (2013) em seus levantamentos. Conforme publicado por KRONOWITZ *et al.* (2016), apenas nos últimos 20 anos, o número de estudos sobre esse tema aumentou 60 vezes. No entanto, ainda em pesquisa recente com cirurgiões plásticos americanos, 49% dos entrevistados acreditam que a falta de evidências científicas acerca do impacto da lipoenxertia no desenvolvimento e na recorrência do câncer de mama representa um obstáculo ao seu uso (KLING *et al.*, 2013). Dessa forma, fica claro que, apesar do crescimento do número de estudos publicados nesse assunto, não têm sido produzidas evidências clinicamente relevantes com impacto na definição de condutas. Os cirurgiões plásticos ainda carecem de diretrizes objetivas para a indicação desse procedimento em pacientes oncológicas (SOFCPRE, 2012; GUTOWSKI, 2009; ASPS, 2012). O devido estudo e a comprovação da segurança oncológica do enxerto de gordura nas mamas permitirá o benefício de maior número de pacientes por meio da indicação desse procedimento autólogo, passível de repetição, de baixo custo, de baixa morbidade e com excelentes resultados estéticos tanto no aumento primário como nas reconstruções de mama.

Calcificações provenientes das áreas de necrose dos enxertos gordurosos foram as primeiras fontes de dúvidas a respeito da segurança da lipoenxertia em casos oncológicos. Acreditava-se que essas calcificações poderiam confundir os radiologistas ao analisar mamografias e dificultar o diagnóstico e o rastreamento

do câncer de mama por meio de tal exame. Esse foi o principal motivo para, em 1987, a *American Society of Plastic and Reconstructive Surgery* (ASPRS) posicionar-se em comunicado oficial contra o uso do tecido gorduroso na reconstrução de mama (ASPRS, 1987). No entanto, estudos de PARIKH *et al.* (2012); RIETJENS *et al.* (2011); AGHA *et al.* (2015); PINELL-WHITE *et al.* (2015b) concluíram que as alterações radiológicas nas mamas submetidas ao enxerto de gordura são pouco frequentes, benignas e não requerem um protocolo de seguimento oncológico ou de rastreamento particular. Comparado à mamoplastia redutora, procedimento amplamente realizado e aceito sem ressalvas na cirurgia de mama, no estudo de RUBIN *et al.* (2012), o enxerto de gordura demonstrou produzir menos alterações radiológicas e escores de *Breast Imaging Reporting and Data System* (BIRADS) mais favoráveis.

Superada a questão do impacto no seguimento radiológico do câncer, outras questões têm sido levantadas. Atualmente, as principais perspectivas do uso terapêutico do enxerto gorduroso na medicina regenerativa e as principais considerações acerca da segurança do seu emprego em pacientes oncológicos residem no mesmo fato: o tecido adiposo foi recentemente descoberto como uma rica fonte de células-tronco mesenquimais (MSCs). Como as células-tronco são componentes habituais do enxerto de gordura, é necessário desenvolver estudos experimentais e clínicos sobre o risco potencial e os limites de segurança do emprego do enxerto de gordura na população de pacientes oncológicas. Como no presente estudo, os modelos experimentais devem também considerar as perguntas clínicas, para que possam caminhar em direção a respostas de questões práticas e ao benefício das pacientes.

Até os anos de 2000, os estudos em medicina regenerativa enfrentavam os entraves éticos e legais do uso de células-tronco embrionárias e tinham nas MSCs derivadas da medula óssea uma alternativa de excelente potencial regenerativo, mas ainda de difícil obtenção e de baixo rendimento. Diante da necessidade de

uma fonte ideal, onde a obtenção das células fosse fácil, de baixa morbidade e alto rendimento, aventou-se, então a possibilidade de estudar o tecido adiposo como fonte de célula-tronco no organismo adulto. Para tanto, ZUK *et al.* (2001), a partir da gordura lipoaspirada realizaram um processamento em diversas etapas, a fim de obter um botão celular da fração estromal vascular. A porção de células desse botão que aderiu ao plástico em cultura foi chamada inicialmente de lipoaspirado processado e, logo mais, de células-tronco derivadas do tecido adiposo (ASCs). Essas células foram caracterizadas quanto ao tempo de duplicação, marcadores de superfície e mostraram-se capazes de diferenciar-se em múltiplos tipos celulares de origem mesenquimal (osteogênese, condrogênese, miogênese e adipogênese), quando expostas a meios de cultura indutores.

Em seguida, essas células foram testadas ainda por ZUK *et al.* (2002) quanto à manutenção de suas características multipotentes após cultura, expressão gênica e síntese protéica diante de diferentes estímulos em meios de cultura, mantendo potencial de pluridiferenciação dentro da linhagem mesodérmica e ectodérmica. Foi realizada, ainda, a imprescindível comparação entre as consagradas células-tronco mesenquimais da medula óssea e as novas células-tronco derivadas do tecido adiposo, evidenciando semelhanças fenotípicas e na capacidade de diferenciação, mas apresentando algumas diferenças em marcadores de superfície e na expressão gênica, provando tratarem-se de diferentes populações celulares.

Desde então, as ASCs já foram implicadas na recorrência de tumores, seja por meio da diferenciação e integração à população tumoral ou pelo aumento da proliferação de células neoplásicas.

LOHSIRIWAT *et al.* (2011); BIELLI *et al.* (2014); BERTOLINI *et al.* (2015); CHARVET *et al.* (2015) revisaram as interações e potenciais complicações do uso de enxerto de gordura em ambiente tumoral da neoplasia mamária e citaram diversos estudos experimentais defendendo que a interação

entre células mamárias neoplásicas e ASCs é favorável à formação e recorrência tumoral.

Essa interação ocorre tanto por contato célula-célula como por ação de fatores secretórios. Em uma revisão narrativa, VONA-DAVIS & ROSE (2007) descreveram adipocinas como um termo genérico utilizado para definir fatores parácrinos e endócrinos produzidos e secretados pelo tecido adiposo, e capazes de interferir no surgimento e na progressão de neoplasias. São exemplos de adipocinas: adiponectina, leptina, resistina, metaloproteinase 11, fator de crescimento derivado de hepatócitos (HGF), colágeno VI derivado de adipócitos, interleucinas 6 e 8, fatores de crescimento transformadores alfa e beta, fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento vascular endotelial e fator derivado de células estromais 1.

Múltiplos estudos apontam que esses fatores estão implicados na interação positiva com a neoplasia mamária contribuindo para maior proliferação de células tumorais, aumento no potencial invasor e metastático e na expressão de genes associados a maior malignidade. Em experimentos *in vitro* e *in vivo*, diversos autores tentaram elucidar diferentes fatores secretórios envolvidos na interação das ASCs com a neoplasia mamária. WALTER *et al.* (2009) citaram a importância da Interleucina-6 na migração e invasão tumoral; DEVARAJAN *et al.* (2012) exploraram a participação do fator de crescimento derivado de plaquetas na transição epitelial-mesenquimal; e ETERNO *et al.* (2014) estudaram a ação do receptor de HGF na proliferação e migração de células do câncer de mama.

Ocorre, na verdade, um fenômeno cíclico, em que não apenas as ASCs atuam sobre a célula neoplásica, mas também sofrem influência dela, como explanaram DIRAT *et al.* (2011). O câncer de mama é capaz de induzir um fenótipo em células do tecido adiposo adjacentes, como por exemplo, o aumento de secreção de IL-6, que resulta numa maior invasão tumoral, permitindo a

sobrevivência e a disseminação do tumor. As células MDA MB 231 e MCF7 mostraram-se capazes de induzir um fenótipo de fibroblastos associados ao câncer nas ASCs, que auxiliam o processo de invasão tumoral, como demonstrado por JOTZU *et al.* (2010). Dessa forma, é possível compreender que o próprio microambiente tumoral pode regular a expressão fenotípica das células adiposas.

O potencial de interação com as células da neoplasia mamária pode variar com a origem das ASCs, conforme estudaram RITTER *et al.* (2015). As ASCs de origem visceral mostraram-se mais capazes que as subcutâneas de aumentar a proliferação, a transição epitelial-mesenquimal, a migração e invasão, por meio do contato direto célula-célula e da secreção de IL-6 e IL-8.

Numa recente revisão narrativa abrangente publicada por SCHWEIZER *et al.* (2015), foi evidenciada uma absoluta maioria de estudos experimentais *in vitro* e *in vivo*, apontando para o efeito positivo das ASCs em relação aos tumores de mama e sugerindo um potencial risco ao uso do enxerto de gordura na população portadora dessa patologia.

No entanto, segundo PARIKH *et al.* (2012), até o momento, não há dados *in vivo* que comprovem a relação entre o enxerto de gordura e a recorrência loco-regional do câncer de mama.

Por outro lado, conforme revisado por FEISS *et al.* (2015), as mesmas ASCs já foram apontadas como potenciais agentes terapêuticos contra o câncer. Esse potencial vai muito além da possibilidade de pluridiferenciação e envolve ainda a capacidade de transportar drogas a sítios tumorais e de inflamação, o potencial de interferir no microambiente tumoral por ação secretória, e a habilidade de imunomodular tecidos e organismos.

Poucos estudos sugerem ação negativa das ASCs e do tecido gorduroso em geral sobre a neoplasia mamária. SUN *et al.* (2009) obtiveram resultados muito semelhantes ao do presente estudo em termos de redução de volume tumoral e menor proliferação celular neoplásica. Entretanto, utilizaram linhagem celular

mais agressiva, de origem metastática e morfologia mesenquimal (MDA MB 231); e a intervenção foi realizada com ASCs em vez do enxerto de gordura completo. Por outro lado, assemelha-se a este trabalho na ortotopia dos enxertos de células neoplásicas e células-tronco no parênquima mamário. Foram testados modelos de coinjeção e de injeção de ASCs após estabelecimento tumoral. Em ambos os modelos, os tumores mamários em contato com as ASCs apresentaram, assim como nos presentes resultados, menor volume final, além de menor incidência de metástases.

KUCEROVA *et al.* (2013) demonstraram menor proliferação de células negativas para receptores hormonais e com superexpressão de HER-2 (linhagem SKBR3) e maior quimiossensibilidade na presença de ASCs em cocultura direta e indireta.

RYU *et al.* (2014) utilizaram também as MCF7, como no presente estudo, e obtiveram resultado de inibição da proliferação de células neoplásicas *in vitro* em presença de ASCs em alta densidade ou de meio de cultura condicionado por elas.

Do ponto de vista clínico, a maior ressalva quanto à lipoenxertia em termos de segurança oncológica reside nas pacientes que recebem tratamento cirúrgico conservador do câncer de mama, como quadrantectomias, setorectomias ou tumorectomias. Essa modalidade cirúrgica foi validada por um grupo italiano, que iniciou na década de 70 um ensaio clínico randomizado, a fim de compará-la à mastectomia. VERONESI *et al.* (2002) publicaram o seguimento de 29 anos de um total de 701 pacientes com tumores menores que dois cm e sem linfonodos palpáveis, evidenciando-se uma maior e mais precoce recorrência nos casos de tratamento conservador, mas nenhuma diferença em metástases à distância, neoplasia em mama contralateral ou incidência de novo tumor primário. Nenhuma diferença foi encontrada na sobrevida global ou específica para o câncer de mama. O risco de realizar lipoenxertia nessas pacientes consiste na alta probabilidade de

haver remanescentes tumorais microscópicos nos sítios a serem reconstruídos e de eles terem contato com células-tronco do tecido adiposo contidas nos enxertos gordurosos.

Atualmente, o potencial neoplásico e estimulador da recidiva tumoral na mama do tecido adiposo permanecem como uma preocupação teórica advinda dos estudos experimentais supracitados, mas vem diminuindo com a experiência clínica. Nas recentes publicações de séries de casos e coortes retrospectivas, RIETJENS *et al.* (2011); PETIT *et al.* (2011); PETIT *et al.* (2012); IHRAI *et al.* (2013); BRENELLI *et al.* (2014); GALE *et al.* (2015); PINELL-WHITE *et al.* (2015b); KRONOWITZ *et al.* (2016); PETIT *et al.* (2017) não foram demonstradas evidências de maior recidiva da neoplasia mamária em sítios de lipoenxertia, alterações radiográficas que possam impedir o rastreamento do câncer de mama ou complicações importantes advindas desse procedimento.

Os estudos clínicos têm progredido rumo à abordagem de situações ainda mais específicas. KAOUTZANIS *et al.* (2016) demonstraram que nas cirurgias secundárias e nos procedimentos de refinamento das reconstruções mamárias com enxerto de gordura, não houve nenhum aumento de recorrência tumoral. KRONOWITZ *et al.* (2016), detectaram que pacientes que receberam lipoenxertia para reconstrução de mama em mastectomias redutoras de risco não apresentaram maior incidência de tumores primários. Um ensaio clínico não aleatorizado desenvolvido por PÉREZ-CANO *et al.* (2012), envolvendo pacientes submetidas a enxerto de gordura enriquecido com células-tronco do tecido adiposo, não evidenciou aumento na recidiva local num seguimento de 12 meses.

PETIT *et al.* (2013) produziram um estudo particularizando a análise de casos de neoplasia intraepiteliais (*in situ*), e relataram um aumento na incidência de recorrência local após o uso de lipoenxertia. No entanto, um viés de seleção na amostra de controles, que possuíam longo intervalo livre de doença, pode ter sido responsável por um artefato estatístico e esse aumento de recorrência não se

confirmou num seguimento do mesmo grupo de pacientes por período mais longo, dados não publicados, mas citados por PETIT *et al.* (2017).

Particularmente a respeito da situação clínica levantada nesta tese, pacientes que receberam tratamento cirúrgico conservador para o câncer de mama e enxerto de gordura como modalidade de reconstrução, foi corroborada por PETIT *et al.* (2017) a ausência de diferenças quanto ao desenvolvimento de recorrência ipsilateral, metástases linfonodais ou à distância, câncer de mama contralateral, novo tumor primário da mama ou à mortalidade, quando comparadas a pacientes que não receberam lipoenxertia. Num estudo de caso-controle incluíram 644 pacientes com neoplasia mamária (322 controles e 322 casos), pareadas quanto à idade, tamanho do tumor, número de linfonodos acometidos, status do receptor de estrogênio, índice proliferativo de Ki67, status de superexpressão de HER-2, uso de quimioterapia neoadjuvante e tipo de radioterapia adjuvante. O tempo médio de seguimento foi de 4,8 anos para casos e 4,4 para controles.

As revisões sistemáticas sobre esse assunto, conforme destacado por AGHA *et al.* (2015), não podem ser realizadas de forma satisfatória em virtude da heterogeneidade e da baixa qualidade dos estudos publicados até o momento. Apesar disso, todas as revisões realizadas por LOHSIRIWAT *et al.* (2011), AGHA *et al.* (2015); KASEM *et al.* (2015), BERTOLINI *et al.* (2015); DE DECKER *et al.* (2016) corroboram os resultados clínicos citados acima. Nenhuma evidência de correlação entre recorrência tumoral e enxerto de gordura foi estabelecida e a necessidade por melhores modelos experimentais é destacada como um ponto-chave para resolver a aparente contradição entre estudos experimentais e clínicos nessa área.

Enquanto não estão disponíveis estudos de coortes prospectivas e ensaios clínicos aleatorizados e controlados, os estudos retrospectivos e as revisões

narrativas podem ser úteis como recursos para estabelecer orientações e políticas regulatórias para garantir a segurança das pacientes.

Na intenção de elaborar um novo delineamento de modelo experimental animal com maior relevância clínica, o presente estudo propõe uma série de mudanças em relação a modelos previamente publicados.

6.2. Características do novo modelo

Dentre os estudos experimentais acerca do assunto, a maioria envolve linhagens celulares, desde as mais invasivas, como as basais triplo negativas, até as de morfologia epitelial e baixa malignidade. Os resultados, ainda que utilizando a mesma linhagem, podem parecer conflitantes, sendo demonstrada ação pró-proliferativa das ASCs no estudo de KUCEROVA *et al.* (2011); e antiproliferativa nos experimentos de SUN *et al.* (2009), ambos utilizando células MCF7 de mesma procedência.

A linhagem celular MCF7 foi estabelecida na *Michigan Cancer Foundation* (de onde deriva a sigla que lhe dá nome) por SOULE *et al.* (1973) a partir da efusão pleural de carcinoma ductal invasivo mamário de uma paciente feminina de 69 anos. Ao longo do tempo, tornou-se a linhagem celular mais utilizada em pesquisa no câncer de mama em todo o mundo. Em levantamento mencionado por BURDALL *et al.* (2003), somente no período de janeiro de 1990 a dezembro de 2003, 5.774 citações foram encontradas sobre células MCF7 no *PubMed*.

As principais vantagens do uso de uma linhagem celular na pesquisa são a facilidade de sua manipulação, a reprodução em cultura de forma ilimitada, a ampla disponibilidade em rede comercial e o seu alto nível de homogeneidade. Para a elaboração de um novo modelo experimental, em que se pretende modificar

etapas fora do âmbito da cultura celular, tais características tornam-se ainda mais valiosas.

Por outro lado, desvantagens também podem ser apontadas: linhagens celulares são imortalizadas e, ao longo de suas reproduções contínuas em cultura, podem sofrer mudanças genótípicas e fenotípicas, como por exemplo, a seleção de uma subpopulação de crescimento mais rápido. Conforme apontado no estudo de OSBORNE *et al.* (1987), apesar de morfologicamente idênticas, as células de uma mesma linhagem podem apresentar diferenças em conteúdo de receptores hormonais, cariótipo e clonogenicidade. Essas diferenças foram evidenciadas entre linhagens comercializadas por laboratórios distintos, podendo dificultar a comparação entre estudos que utilizam células de fornecedores diferentes, mas não repercutindo diretamente em viés num experimento como o deste estudo, cujas células neoplásicas têm a mesma procedência.

Os resultados do presente estudo demonstram uma homogeneidade evidente entre os grupos quanto aos volumes tumorais aferidos e às características histológicas dos tumores encontrados, conforme os escores de grau histológico e a análise das lâminas de tumores em HE. Essa homogeneidade desfavorece a possibilidade de que a linhagem celular, ao reproduzir-se na formação dos tumores, possa ter alterado as suas características biológicas a ponto de interferir nos resultados. Por outro lado, a ocorrência de tumores tão homogêneos pode dificultar a evidência de diferenças estatisticamente significantes entre as intervenções aplicadas.

Apesar de a linhagem celular utilizada ser derivada de efusão pleural e, portanto, representar população celular metastática, supostamente com maior potencial proliferativo e disseminativo, as células MCF7 são consagradas como as mais utilizadas em modelos experimentais *in vitro* e *in vivo* para o estudo da neoplasia mamária primária positiva para receptores hormonais. Além disso, conforme destacado por HOLLIDAY & SPEIRS (2011), ela é reconhecida por

um perfil molecular semelhante ao luminal A, tipo mais frequente entre as mulheres acometidas pelo câncer de mama. Esse perfil, segundo a classificação molecular proposta por PEROU *et al.* (2000), caracteriza-se por positividade para receptores de estrogênio, positividade ou negatividade para receptor de progesterona e negatividade para o receptor do fator de crescimento epidérmico humano 2 (HER2), podendo-se prever uma boa resposta a tratamento hormonal. Geralmente, esses tumores têm baixo índice de ki67, o que demonstra baixa proliferação.

A escolha da linhagem MCF7, neste estudo, é concordante com os estudos de WALTER *et al.* (2009); JOTZU *et al.* (2010); DEVARAJAN *et al.* (2012); KUCEROVA *et al.* (2011) e ETERNO *et al.* (2014), que optaram por usar essa linhagem celular por tratar-se da melhor representação de tumores menos invasivos, com morfologia epitelial e receptores hormonais. No presente estudo, a intenção de representar tumores residuais em pacientes submetidas à cirurgia conservadora da mama requeria uma linhagem celular com as características citadas. Este estudo opõe-se aos de SUN *et al.* (2009), que utilizou MDA MB 231, célula mesenquimal e triplo negativa; e de KUCEROVA *et al.* (2013), que utilizou SKBR3, célula HER2 positiva e negativa para receptores hormonais; nos quais se representam tipos mais agressivos de tumores, que são encontrados em menor frequência no grupo de pacientes submetidas à cirurgia conservadora para o tratamento do câncer de mama.

O uso de linhagens celulares, imortalizadas e capazes de proliferar-se rapidamente, falha em incluir no modelo experimental os aspectos da heterogeneidade da composição tumoral, as células ocultas e dormentes, o que é especialmente importante quando se considera a associação entre tratamento cirúrgico conservador para o câncer de mama e terapia regenerativa. DONNENERG *et al.* (2010) criticaram os vigentes modelos experimentais da interação de ASCs e câncer de mama em cocultura e xenoenxerto por utilizarem

majoritariamente linhagens celulares rapidamente proliferativas e com grande potencial invasor, que representariam tumores de rápido crescimento e não responsivos a medidas terapêuticas, situação clínica na qual a reconstrução de mama não seria indicada, contribuindo para uma falta notável de realismo clínico.

Certamente as limitações decorrentes do uso de linhagens celulares impulsionam o estudo em neoplasia mamária a caminhar em direção ao uso de produtos celulares isolados de tumores primários. A manutenção de características moleculares e histológicas genuínas do tumor é um grande argumento em favor disso. No entanto, por mais cientificamente coerente, esse caminho tem se mostrado longo e árduo. Conforme discutido por BURDALL *et al.* (2003), ainda hoje as técnicas para explante das células epiteliais de um tumor primário estão em constante desenvolvimento e validação. A regulação ética para obtenção delas dificulta a ampla disponibilidade de material, uma vez que todo o produto doado para uso em pesquisa será uma parte do tumor não analisada pelo patologista e não incluída no planejamento terapêutico da paciente doadora. E o risco para as pacientes não seria aceitável. A manutenção de tais células em cultura e a sua aplicação em experimentos são desafiadoras devido ao longo tempo de duplicação populacional e à senescência precoce. Muitos dos isolados primários duram apenas duas ou três passagens, o que não permite obter o número de células necessário para um experimento de grande porte. Além disso, não deve ser ignorado que, mesmo células primárias de tumor, uma vez isoladas e cultivadas, podem assumir comportamento biológico diferente do que teriam quando são parte de um tecido ou órgão, uma vez que a interação intercelular e células-estroma tecidual é perdida na cultura *in vitro*.

Apesar de todas as questões acerca da representatividade de linhagens celulares em relação aos tumores primários, é consenso que as elas ainda são recursos experimentais poderosos e em muitas situações têm fornecido evidências translacionais para o benefício clínico, como nos estudos de WALTER *et al.*

(2009); JOTZU *et al.* (2010); DEVARAJAN *et al.* (2012); KUCEROVA *et al.* (2011); ETERNO *et al.* (2014); SUN *et al.* (2009) e KUCEROVA *et al.* (2013).

Os modelos experimentais *in vivo* utilizados até o momento, como em WALTER *et al.* (2009); DEVARAJAN *et al.* (2012) e ETERNO *et al.* (2014), falham em simular a interação entre o enxerto de gordura e sítios potencialmente residuais de neoplasia mamária, como as pacientes submetidas ao tratamento cirúrgico conservador do câncer de mama. De modo geral, os xenoenxertos são compostos de células de linhagens comercialmente disponíveis preparadas por diluição seriada de suspensões provenientes da digestão enzimática de culturas e utilizadas em grande número como milhões ou centenas de milhares.

Neste modelo, no entanto, com a intenção de simular tumores residuais, optou-se por realizar xenoenxerto de apenas 1.000 células, testado em estudo piloto como número mínimo capaz de formar tumores palpáveis em 100% dos animais ao final do seguimento de oito semanas. Pela natureza própria das células MCF7, elas tendem a formar aglomerados celulares quando digeridas por tripsina a partir de uma cultura em camada única. Dessa forma, a diluição seriada apresenta uma grande perda de precisão quanto ao número final de células presentes em cada xenoenxerto. Certamente, a fim de criar alíquotas com um pequeno número de células como 1.000, imprecisão no número de células injetadas criaria um importante viés. Conforme destacado na revisão de BARTENEVA *et al.* (2013), o método escolhido de distribuição celular automatizada, a distribuição ativada por citometria de fluxo (DA CF), é muito preciso ao contar células individuais, diferenciá-las de aglomerados celulares e também células viáveis das apoptóticas ou mortas. Esse método permite o isolamento e a purificação de células malignas para o estudo subsequente, seja ele molecular, de síntese protéica, de expressão gênica, ensaios de clonogenicidade ou xenotransplantes.

Somente a análise da dispersão de luz anterior (FSC-*forward scatter*) e lateral (SSC- *side scatter*), conforme realizado neste estudo, já permite obter 3 populações de uma suspensão homogênea de células: células vivas, células apoptóticas e células mortas. O refinamento dessa separação celular pode ser feito por meio de um corante de ácido desoxirribonucleico (DNA), como o 4', 6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), utilizado no presente método, que é capaz de ligar-se ao DNA após penetrar a membrana não íntegra das células, portanto marca as células mortas e apoptóticas, não viáveis para o xenoenxerto. Ainda conforme relataram BARTENEVA *et al.* (2013), a identificação precisa de células apoptóticas é fundamental, uma vez que diferentes populações de células neoplásicas têm sensibilidade variada para procedimentos de manipulação e dissociação e podem gerar diferentes frações de células apoptóticas, prejudicando o potencial de formação tumoral de um xenoenxerto.

Após a obtenção de uma alíquota precisa de 1.000 células vivas para cada xenoenxerto a ser aplicado nos animais, diversas medidas foram empregadas para reduzir a perda de células durante a manipulação do conteúdo após a DACF. O uso de células carregadoras em uma quantidade dez vezes superior à de células viáveis foi importante para evitar perdas por adesão das células vivas às placas de poços, seringas e agulhas utilizadas para acondicionamento e transferência aos animais das células tumorais. As células foram irradiadas para a inibição de sua capacidade proliferativa e foram testadas para tal, comprovando que não contribuíram para o crescimento tumoral, servindo apenas de veículo para reduzir perdas de células viáveis. Foram cultivadas isoladamente em placas por 14 dias e não apresentaram proliferação. As placas, onde as células foram distribuídas, tinham a base em “V” para facilitar a aspiração completa de seu conteúdo, e eram compostas de polipropileno, material plástico que não permite adesão celular como o poliestireno das placas de cultura habituais. Dessa forma, procurou-se impedir a perda celular nas placas de transporte.

A aplicação do enxerto de células neoplásicas foi feita isoladamente precedendo a intervenção que se deseja analisar (por exemplo, o enxerto de gordura), o que é muito importante quando se deseja elaborar um modelo experimental clinicamente relevante. A maioria absoluta dos estudos prévios, como, por exemplo, WALTER *et al.* (2009); DEVARAJAN *et al.* (2012) e ETERNO *et al.* (2014), realizam coinjeções de células do câncer de mama com células-tronco do tecido adiposo.

Tal situação não se correlaciona em absoluto com o cenário clínico, uma vez que a reconstrução de mama em pacientes oncológicas ocorre em sítios onde o tumor já se instalou sem a interferência dos métodos de reconstrução. Ou seja, o enxerto de gordura é realizado em áreas de tumores plenamente estabelecidos sem a interferência parácrina do tecido adiposo, que produz diversos fatores secretórios capazes de interferir no surgimento e crescimento tumoral no câncer de mama. Também os estudos de JOTZU *et al.* (2010) e DIRAT *et al.* (2011), destacaram a importância da ação do tumor sobre as ASCs induzindo nessas células um fenótipo pró-proliferação e pró-invasão tumoral, sugerindo que ao realizar coinjeção, estaria sendo estudado o efeito de ASCs já expostas à modificação pela ação tumoral.

No presente estudo, apenas após duas semanas, quando já integrados (dado confirmado em estudo piloto) e, em sua maioria com tamanho palpável, os tumores receberam a intervenção, seja ela com solução salina ou enxerto de gordura.

Em todo o seguimento do presente estudo e de seu estudo piloto, ao contrário da constatação de ZIMMERLIN *et al.* (2010), que tiveram um índice de 36% de linfomas murinos espontâneos em experimento com a mesma linhagem de camundongos imunossuprimidos, não foi identificado nenhum tumor além da neoplasia mamária nos sujeitos do presente estudo, seja nos sítios de enxertos de MCF7 e gordura, ou à distância.

O conteúdo da intervenção é outro tópico que representa limitação nos delineamentos experimentais. Até o momento, os estudos têm se concentrado em injetar ASCs isoladas e proliferadas em cultura e em números bastante altos, chegando a um milhão de células por sítio tumoral, ou em proporções altas em relação às células tumorais. No estudo de ETERNO *et al.* (2014), ASCs e células neoplásicas foram coinjetadas em proporção de 2:1; nos de WALTER *et al.* (2009) e DEVARAJAN *et al.* (2012), na de 1:1. No entanto, sabe-se, pelos experimentos de KOKAI *et al.* (2016) e pelas observações de GALE *et al.*, (2015), que a proporção de células-tronco em relação ao total de componentes do tecido adiposo é muito pequena, aproximadamente de 2 a 10%. Dessa forma, injetar quantidades elevadas de ASCs, muitas vezes iguais ou até mesmo superiores ao número de células neoplásicas no xenoenxerto, não simula um microambiente real e tende a superestimar a ação das células-tronco sobre os tumores. Além disso, a administração a sujeitos humanos de células-tronco isoladas e cultivadas não é permitida em vários países, incluindo Brasil e Estados Unidos, o que reforça ainda mais a irrelevância clínica desse tipo de modelo, que promove comparação não reprodutível clinicamente e contribui para desfavorecer um procedimento extremamente promissor baseado em conclusões enviesadas.

Os modelos experimentais passarão a prestar maior contribuição para o esclarecimento da segurança oncológica do tecido adiposo na reconstrução de mama na medida em que se concentrarem em simular situações de enxerto de gordura ou de fração estromal vascular (preparado de tecido adiposo por meio de digestão enzimática e centrifugação, cujo uso é permitido clinicamente).

DONNENBERG *et al.* (2010) e CHARVET *et al.* (2015) reforçaram as considerações acima acerca das limitações dos modelos experimentais atuais. Referem que a natureza das linhagens celulares mais utilizadas, como a MDA MB 231 (extremamente invasiva, metastática e triplo negativa) e a alta proporção de ASCs misturadas às células neoplásicas em coinjeções para xenoenxerto

(superestimando a exposição dos tumores às células progenitoras) dificultam a translação do conhecimento experimental para a pesquisa clínica, tornando cada vez menor a contribuição de tais estudos para a solução dos problemas práticos no cuidado aos pacientes.

A realização de experimento *in vivo* acrescenta a complexidade do organismo aos estudos em detrimento dos ensaios exclusivamente *in vitro*. O camundongo NOD-SCID gamma é considerado um modelo ideal para xenoenxertos, por não apresentar reações imunológicas à presença de células humanas. É certo que a imunodeficiência, que permite essa tolerância, traz consigo a limitação de poder interferir na formação e na progressão dos tumores mamários.

O sítio escolhido para a injeção do xenoenxerto também é de grande importância no delineamento experimental. Muitos dos estudos sobre a interação entre ASCs e neoplasia mamária realizam xenoenxertos heterotópicos, como ETERNO *et al.* (2014), no dorso de animais; e WALTER *et al.* (2009), sob a cápsula renal. A presença do tecido adiposo nos sítios de enxerto de células mamárias é um requerimento importante para a proliferação celular e a formação ductal. No entanto, o tipo de gordura a receber um enxerto (mamária, subcutânea, peritoneal) pode alterar ou mesmo impedir o crescimento do tecido mamário. Conforme revisão de HOVEY *et al.* (1999), a gordura da mama é favorável ao crescimento de tecido epitelial mamário enxertado. Já a gordura subcutânea lateral é desfavorável, tornando a glândula mamária do camundongo um sítio mais adequado para o xenoenxerto de câncer de mama do que o subcutâneo dorsal. Os enxertos heterotópicos privam as células neoplásicas e as células do tecido adiposo de interagir com o tecido mamário e tendem a expressar muito mais uma interação célula-célula, negligenciando toda a complexidade do ambiente da glândula mamária. Além disso, podem introduzir o viés da interação com outras populações celulares não presentes na glândula mamária, mas em outros tecidos.

No presente estudo, assim como em DEVARAJAN *et al.* (2012), o implante de células neoplásicas e o enxerto de gordura foram realizados em sítios nas glândulas mamárias dos camundongos (dois torácicos e dois inguinais) e essa topografia foi confirmada em necropsia de todos os animais, realizada pelo mesmo avaliador. Desse modo, os processos biológicos estudados puderam ocorrer não apenas num organismo vivo, mas no interior da glândula que abriga naturalmente esse tipo de neoplasia. No entanto, conforme foi destacado por HOVEY *et al.* (1999), ainda assim há a ressalva de que as glândulas mamárias humanas e de camundongos têm morfologia e componentes estromais diferentes. Os fatores de crescimento, proteases e matriz extracelular sabidamente sintetizados pela glândula mamária, seja no seu componente adiposo ou glandular, podem ter ações diferentes sobre a neoplasia mamária de acordo com a espécie de que se originam. Essas considerações biológicas reforçam que os resultados provenientes de estudos em roedores não podem ser extrapoladas para a espécie humana.

6.3. Critérios de avaliação do novo modelo

Quanto à escolha dos critérios de avaliação dos tumores, inúmeros fatores já foram estudados na intenção de definir seu papel prognóstico na evolução da neoplasia mamária. HAYBITTLE *et al.* (1982) e TODD *et al.* (1987) realizaram uma análise de regressão múltipla em estudos clássicos do grupo britânico de Nottingham, apontando três fatores prognósticos principais do câncer de mama: tamanho do tumor, grau histológico e acometimento linfonodal. No presente estudo, optou-se por utilizar os dois primeiros fatores, por serem próprios do tumor primário. Mais recentemente, em estudos de TASHIMA *et al.* (2015) e CHO *et al.* (2016) também o terceiro parâmetro analisado no presente estudo, o índice proliferativo medido pela expressão de Ki67, foi apontado em análises

univariadas e multivariadas como fator prognóstico associado à sobrevida global e livre de doença.

O tamanho, expresso em volume, dos tumores que receberam intervenção com enxerto de gordura foi menor que o dos que receberam solução salina, e essa diferença foi estatisticamente significativa. Em princípio, a explicação mais direta para esse fato envolve o efeito compressivo do tecido gorduroso sobre o tumor, não exercido pela solução salina.

A caracterização das propriedades mecânicas de tumores sólidos e tecidos vizinhos vem sendo estudada apenas recentemente, mas um fato claro já foi estabelecido: a progressão tumoral é intimamente relacionada à geração e ao acúmulo de estresse mecânico nas adjacências do tumor, envolvendo tanto fluidos quanto sólidos. Tais achados podem permitir a compreensão não apenas da redução de volume, mas também da menor proliferação celular nos tumores que sofreram o efeito de estresse mecânico do enxerto de gordura em sua proximidade.

Conforme revisão de STYLIANOPOULOS (2017), o estresse mecânico nas adjacências do tumor mamário, como a presença do enxerto de gordura, pode afetar o crescimento tumoral de duas formas: por compressão direta do tumor e por compressão de vasos sanguíneos e linfáticos que o irrigam. A compressão de vasos sanguíneos causa hipoperfusão e hipóxia, que favorecem a progressão do tumor; redução de resposta imune; indução de um fenótipo de célula-tronco neoplásica, mais resistentes à hipóxia e potencialmente às drogas citotóxicas; e resistência a tratamentos através da promoção de angiogênese e transição epitelial-mesenquimal, etapa fundamental para a ocorrência de metástases. A compressão de vasos linfáticos, por sua vez, causa aumento da pressão hidrostática intersticial, criando um gradiente de fatores de crescimento e de células tumorais em direção centrífuga ao tumor, contribuindo para o crescimento, a invasão local e a progressão metastática.

A mesma linhagem celular usada no presente estudo, a MCF7, demonstrou no estudo de CHENG *et al.* (2009), num modelo de microesferas tumorais de neoplasia mamária, que a compressão direta de células neoplásicas reduz a proliferação celular e induz apoptose. Tais achados suportam os presentes resultados em que tumores submetidos à compressão extrínseca pelo enxerto de gordura apresentaram redução de volume e do índice proliferativo.

À macroscopia, foi evidenciada uma incidência maior de invasão local no grupo que recebeu solução salina. Houve invasão de pele, musculatura (nos sítios superiores) e peritônio (nos sítios inferiores). Quanto à musculatura e à invasão independentemente do tecido, o grupo do enxerto de gordura teve estatisticamente menos invasão. Devido à necessidade de dissecar precisamente os tumores para medida de peso e volume, não foi possível avaliar invasão de tecidos vizinhos microscopicamente. Não foram detectados linfonodos aumentados ou lesões metastáticas em fígado, baço e pulmões na análise macroscópica durante a necropsia.

O estresse mecânico pode ser visto também como um fator causal para a redução de invasão. No estudo de TSE *et al.* (2012), foram analisadas linhagens celulares de câncer de mama com diferentes potenciais invasivos, incluindo a MCF7, e observou-se que o estresse mecânico promoveu aumento da migração e invasão em linhagens mais agressivas e que já tinham sofrido transição epitelial para mesenquimal. No caso da MCF7, houve, na verdade, supressão da invasão. Isso corrobora o resultado do presente estudo, em que os tumores formados de células MCF7 e submetidos à lipoenxertia adjacente sofreram maior estresse mecânico que o grupo controle, mas não apresentaram aumento de metástases ou invasão local.

Os achados são concordantes com ETERNO *et al.* (2014), que demonstraram não haver aumento de proliferação ou estimulação à migração de células MCF7 por meio do contato com ASCs, resultando em tumores sem

aumento de volume ou do potencial metastático. Esse efeito foi absolutamente antagônico ao obtido em células MDA MB 231. Os autores comprovaram por imuno-histoquímica que as células MDA MB 231 expressam maiores quantidades de receptor do fator de crescimento hepatocitário (HGFR) e fizeram a hipótese de que isso poderia estar implicado na diferente interação dessa linhagem celular com as ASCs.

RITTER *et al.* (2015), por sua vez, apresentaram resultados conflitantes em relação a ETERNO *et al.* (2014); TSE *et al.* (2012) e ao presente estudo. Em experimentos exclusivamente *in vitro*, evidenciaram que ASCs de origem epitelial e visceral foram capazes de estimular a proliferação, a migração, a invasão e a transição epitelial-mesenquimal em células MCF7 com uma intensidade maior que em células mais invasivas como a MDA MB 231. Imputou esse efeito contraditório ao aumento da expressão de proteína do linfoma de células B-6 (BCL-6), proteína inibidora de transcrição e fundamental para a progressão do câncer de mama, nas MCF7, induzido pelo contato com ASCs.

No presente estudo, assim como em publicações prévias, fica evidente que a redução de proliferação e tamanho tumoral provocados pelo estresse mecânico ao redor do tumor não ocorrem necessariamente associadas a uma maior disseminação de células tumorais, o que parecia fisiologicamente plausível, considerando-se que as células migrariam de forma centrífuga em busca de melhor aporte de nutrientes e de oxigênio.

No entanto, diante de miríade de estudos apontando para a atividade secretória parácrina e endócrina da gordura como VONA-DAVIS & ROSE (2007), WALTER *et al.* (2009) e DEVARAJAN *et al.* (2012), KUCEROVA *et al.* (2013), ETERNO *et al.* (2014), RYU *et al.* (2014), RITTER *et al.* (2015), GALE *et al.* (2015), seria limitado pensar que todo o efeito sobre os tumores foi exclusivamente mecânico. Como destacaram FEISS *et al.* (2015), em detrimento de todo o interesse em estudar a diferenciação e a ação celular das ASCs, cada

vez mais, elas são compreendidas por meio do estudo dos seus *bystander effects*, que consistem na ação por meio de seu secretoma, podendo modular respostas imunológicas e inflamatórias e modificar a constituição do microambiente em que se inserem, alterando os componentes estromais, fundamentais à evolução tumoral.

Nesse contexto, motivados por estudos prévios em que estímulos distintos via receptores *toll-like* (TLR) induziram perfil pró-inflamatório ou anti-inflamatório em células-tronco mesenquimais, WATERMAN *et al.* (2012) demonstraram que essas diferentes respostas imunológicas podem repercutir diretamente na interação com os tumores mamários. As células-tronco polarizadas para o perfil pró-inflamatório promoveram menor crescimento, menor invasão, menor formação de colônias e menor ocorrência de metástases nas células neoplásicas. As células polarizadas para o perfil anti-inflamatório e imunossupressor tiveram os efeitos opostos. Dessa forma, compreende-se que as células-tronco do tecido adiposo são passíveis de polarização. É possível supor, portanto, que no interior do enxerto gorduroso preparado por lipoaspiração e centrifugação conforme a técnica de Coleman, em vez de isoladas e manipuladas em cultura, as ASCs apresentem um perfil menos pró-tumorigênico ou até mesmo antitumorigênico. Essa suposição estaria em acordo com SUN *et al.* (2009), KUCEROVA *et al.* (2013) e RYU *et al.* (2014) e com os achados do presente estudo de tumores menores e menos proliferativos no grupo que recebeu enxerto de gordura. Estaria também em acordo com estudos clínicos, que não mostram aumento de recidiva local dos tumores em paciente cujas mamas foram reconstruídas com enxerto gorduroso. No entanto, apenas após novos estudos na área de imunologia e no uso de células-tronco mesenquimais no tratamento do câncer será possível esclarecer se essa suposição é pertinente.

Controvérsias e até mesmo contradições são comuns nos estudos pré-clínicos e a interação entre o mesmo tipo de célula neoplásica e de célula-tronco

pode oferecer resultados de aumento ou redução da proliferação tumoral. Conforme revisado por SUN *et al.* (2014), os efeitos do microambiente tumoral sobre as MSCs podem induzir diferentes comportamentos biológicos nessas células, principalmente em termos de secretoma, o que repercute diretamente em diferentes efeitos sobre a proliferação progressão tumoral.

A maioria dos estudos nessa área tem se dedicado extensivamente a discutir os efeitos das ASCs favoráveis à neoplasia mamária. Por outro lado, o potencial inibitório das ASCs não foi esclarecido e seus mecanismos são predominantemente desconhecidos. Conforme destacado por DONNENBERG *et al.* (2010), a heterogeneidade das células do câncer de mama e a diferente interação de ASCs com células ativas e dormentes pode contribuir para a seleção correta de pacientes a receberem lipoenxertia para a reconstrução de mama. Assim como a mesma célula-tronco mesenquimal, dependendo do estímulo que a polariza, pode ter diferentes ações sobre uma célula tumoral, também é necessário considerar que a mesma célula-tronco pode ter diferentes ações sobre diferentes células que compõem o mesmo tumor. No estudo de ZIMMERLIN *et al.* (2011), foram identificadas duas populações celulares dentre vários componentes da efusão pleural metastática de câncer de mama: uma de células grandes e ativas (com conteúdo de DNA denotando proliferação ativa) e uma de células pequenas e quiescentes. Em um modelo *in vivo*, demonstraram que as ASCs estimularam o crescimento tumoral a partir de células grandes e ativas possivelmente por meio da secreção de fatores de crescimento e angiogênese, mas foram incapazes de interferir na formação e na proliferação dos tumores formados a partir de células pequenas e inativas. Esse estudo destaca a importância de entender que, assim como as ASCs são diferentes conforme o microambiente em que estão inseridas, também os tumores mamários são heterogêneos conforme as células que os compõem, o que acrescenta uma enorme complexidade ao estudo dessa interação.

Dentre as diversas características histológicas da neoplasia mamária, foram escolhidos no presente estudo o grau histológico aferido por meio do escore de Bloom e Richardson e o índice de proliferação aferido pela positividade para Ki67. A escolha de tais parâmetros foi definida ainda na intenção de delinear situação experimental o mais semelhante possível ao cenário clínico. Dessa forma, foram eleitas as variáveis citadas por tratarem-se de itens obrigatórios nas biópsias de pacientes humanas. Na literatura, como em WALTER *et al.* (2009) e DEVARAJAN *et al.* (2012), KUCEROVA *et al.* (2013), ETERNO *et al.* (2014), RYU *et al.* (2014), RITTER *et al.* (2015), os estudos concentram-se muito mais em características moleculares, secretórias e expressão gênica das células neoplásicas em presença do tecido adiposo. Não há relatos de comparação de grau histológico conforme realizado no presente estudo com intenção de promover uma conexão translacional à prática clínica. O Ki67, por sua vez, tem sido utilizado em estudos prévios como o de ZIMMERLIN *et al.* (2011).

A análise molecular dos tumores, assim como expressa nos laudos de biópsia das neoplasias primárias de mama não foi realizada, por tratarem-se de tumores provenientes de linhagem celular já caracterizada quanto à presença de receptores hormonais e à expressão de HER 2.

O valor do conceito de grau histológico deriva de um aspecto fundamental da histopatologia: as características morfológicas de um tumor podem ser correlacionadas ao seu grau de malignidade. ELSTON & ELLIS (1991) tiveram uma iniciativa histórica nas décadas de 70 e 80 do século passado, realizando um estudo com 2200 pacientes portadoras de neoplasia primária das mamas para avaliar a importância relativa de diversos fatores prognósticos no câncer de mama. A partir desse estudo, foi demonstrado o valor do grau histológico dos tumores de mama como fator prognóstico independente para a evolução das pacientes. Foram demonstrados menor intervalo livre de doença e menor sobrevida em pacientes com tumores de maior grau histológico, portanto, menos diferenciados.

O estudo do grau histológico foi padronizado para adenocarcinomas invasivos e apresenta limitações quanto ao uso em tumores *in situ*. No presente trabalho, a julgar pela linhagem celular escolhida MCF-7 e pelo aspecto histológico das amostras, tratavam-se todos de tumores invasivos, sendo válido o uso do escore de Bloom e Richardson modificado por Elston e Ellis. Nessa avaliação, são considerados os fatores: formação tubular, pleomorfismo nuclear e contagem mitótica. A formação tubular diz respeito ao aspecto histológico saudável da glândula mamária, portanto, quanto mais predominante a visibilização do lúmen tubular, menor a pontuação no escore de grau histológico. O pleomorfismo nuclear é avaliado de forma quantitativa e qualitativa: núcleos pequenos, de contornos regulares, cromatina uniforme e com pouca variação intercelular em tamanho, contribuem com menor pontuação para o grau histológico. A contagem mitótica deve ser avaliada preferencialmente na periferia do tumor, por tratar-se de sua área mais ativa de crescimento. Apenas os núcleos evidentemente em metáfase, anáfase ou telófase pontuam para essa contagem. Quanto maior a pontuação no escore, maior o grau histológico e mais pobre a diferenciação do tumor.

A crítica mais comum ao uso do grau histológico como fator prognóstico, citada por ELSTON & ELLIS (1991), é a relativa subjetividade do método, o que pode acarretar perdas em termos de consistência e reprodutibilidade. O fator mais importante na superação dessa crítica é o treinamento do patologista. No presente estudo, todas as lâminas foram avaliadas por patologista especialista em histopatologia mamária e com mais de duas décadas de experiência na área. Menores índices de concordância podem ser decorrentes de patologistas pouco experientes ou carentes em treinamento no uso específico do escore em questão. Idealmente, a avaliação deve ser feita em duplicata pelo mesmo patologista ou por dois patologistas adequadamente treinados, quando disponíveis.

De acordo com o resultado deste estudo, o uso de enxerto gorduroso em sítio tumoral de neoplasia mamária residual não apresentou aumento do escore de Bloom e Richardson dos tumores em relação à aplicação de solução salina. Não houve, portanto, indução de menor diferenciação ou piora do grau histológico nos tumores com o uso da lipoenxertia.

JONAT & ARNOLD (2011) destacaram o Ki-67 como um excelente biomarcador de proliferação, presente exclusivamente em células que estão se proliferando, ou seja, nas fases G1, S, G2 e M do ciclo celular, mas não na fase G0 das células quiescentes. A sua expressão é crescente em direção à fase de mitose. Dentre as opções de marcadores, o Ki-67 apresenta vantagens no estudo da neoplasia mamária por ser expresso em células normais e malignas, sendo um método fácil e confiável para estudo do ciclo celular.

No entanto, a *American Society of Clinical Oncology* (ASCO), na última recomendação publicada por HARRIS *et al.* (2007) não inclui ainda o Ki-67 como marcador biológico de rotina para a investigação diagnóstica do câncer de mama nem como fator prognóstico. A falta de padronização dos reagentes, procedimentos para coloração e leitura das lâminas são fatores apontados como pilares para essa decisão. Até o momento, não havia uma iniciativa para definir oficialmente o ponto de corte padrão para o seu índice, dificultando a comparação entre estudos e laudos de diferentes laboratórios.

Conforme TASHIMA *et al.* (2015) seu valor prognóstico tem sido documentado e altos níveis de Ki-67 correlacionam-se com maior tamanho tumoral, alto grau histológico, linfonodos positivos, tipos moleculares triplo negativos ou HER-2 positivos e menor tempo de sobrevida global. Além disso, pode ser útil para prever resposta terapêutica aos quimioterápicos e inibidores de aromatase.

Ainda de acordo com TASHIMA *et al.* (2015) e CHO *et al.* (2016), utilizando a mesma metodologia do presente estudo para confecção de lâminas

(anticorpo primário e coloração automatizada), foi sugerido um novo ponto de corte de 20% para a definição de tumores altamente proliferativos conforme o índice de Ki-67, especialmente no tumor luminal A (negativo para HER 2). O maior índice de proliferação tumoral repercute em pior prognóstico expresso por um menor tempo de sobrevida global e livre de doença. Evidências em contagens manuais e automatizadas demonstraram superioridade do ponto de corte de 20% em relação a 10% e 14%. Neste estudo, independentemente do corte de 10%, 14% ou 20% os tumores de ambos os grupos seriam considerados muito proliferativos, sendo a média no grupo Lipo, índice proliferativo de 24,5% e, no grupo Salina, 27,7%.

O MIB-1, anticorpo utilizado nesse estudo para marcar o Ki-67, é um anticorpo monoclonal desenvolvido na década 1990 contra partes recombinantes do antígeno Ki-67. A sua maior vantagem em relação a métodos anteriores é a reatividade contra epítomos submetidos a processo padrão de fixação em parafina, o que permite preservar melhor a arquitetura tecidual e o conteúdo antigênico. Até então, os anticorpos mais usados eram diretos anti-Ki67 e aplicavam-se apenas a tecidos congelados. Pouco tempo após a sua descoberta, ELLIS *et al.* (1996) compararam a medida de índice proliferativo pelo uso do MIB-1 a métodos consagrados de avaliação da proliferação celular, como a determinação da fração de células na fase S do ciclo celular por citometria de fluxo de DNA, mostrando equivalência ainda melhor que o anticorpo direto para Ki-67.

No presente estudo, o grupo Lipo teve tumores com menor índice de Ki-67 que o grupo salina, de modo que a presença do enxerto de gordura não promoveu aumento da proliferação celular na neoplasia mamária.

Os presentes resultados são apoiados pelos estudos de SUN *et al.* (2009), KUCEROVA *et al.* (2013) RYU *et al.* (2014), os quais sugeriram previamente que as ASCs, componentes do enxerto gorduroso muito ativos do ponto de vista

secretório, poderiam reduzir a proliferação e a invasão das células MCF7 *in vitro* e *in vivo*, por vias moleculares envolvendo o IFN beta.

Os resultados da redução de proliferação pelo índice de ki-67 e redução de volume no grupo de tumores submetidos à lipoenxertia adjacente são concordantes. Tumores que se proliferam menos têm, de fato, a tendência de apresentar volumes finais menores. Essa concordância, cujo sentido fisiopatológico é evidente, foi comprovada por BOTTINI *et al.* (2001) num estudo da resposta terapêutica a quimioterápicos. A mesma concordância, no entanto, não é comprovada entre esses parâmetros e o grau histológico, que não acompanhou a redução observada no volume e no índice proliferativo no presente estudo. É possível presumir que essa não concordância do grau histológico decorre do uso de linhagem celular, o que resulta em tumores muito homogêneos entre os grupos, tornando difícil evidenciar diferenças estatisticamente significantes mediante o uso de diferentes intervenções. Além disso, especialmente quando a variável analisada é categórica, como o grau histológico, e não numérica, como o volume tumoral e o índice de Ki-67, por uma questão estatística, agrupam-se numa mesma categoria tumores com diferentes valores numéricos de escores, possibilitando que algumas diferenças mais sutis não sejam demonstradas.

A ausência de metástases em ambos os grupos é um achado aparentemente inesperado, considerando que a origem da linhagem celular MCF7 provém de um derrame pleural metastático. No entanto, BURDALL *et al.* (2003) apontaram que quando em xenoenxertos, as células neoplásicas de origem metastática apresentam comportamento biológico menos invasivo que em experimentos *in vitro*, a menos que essas células sejam injetadas diretamente na corrente sanguínea do animal em modelo próprio para o estudo de disseminação tumoral hematogênica. Tais evidências favorecem a hipótese de que as células neoplásicas, assim como as ASCs, podem ter comportamento biológico diverso a

dependem do microambiente em que estão inseridas e da via em que são administradas.

6.4. Aspecto translacional do novo modelo

Considerando os resultados acima discutidos, a segurança oncológica do enxerto de gordura encontra apoio no presente modelo experimental. Os resultados de estudos prévios *in vitro* e *in vivo* que geram preocupações aos oncologistas, mastologistas e cirurgiões plásticos, embora muito bem fundamentados em experimentos reprodutíveis e tecnicamente bem elaborados, não vêm se dedicando ao aspecto translacional da ciência. O uso de grandes números de células tumorais, o emprego de linhagens celulares altamente invasivas e proliferativas, os enxertos heterotópicos em dorso de animais, o uso de células-tronco derivadas do tecido adiposo isoladas e cultivadas são apenas alguns dos aspectos recorrentes em modelos prévios que desequilibram a balança em favor do potencial nocivo dos enxertos de gordura. Os modelos disponíveis atualmente têm sido muito eficientes em produzir evidências científicas, mas não em avançar para delinear cenários clinicamente relevantes.

Na realidade, as pacientes que recebem lipoenxertia em sítios potencialmente portadores de neoplasia residual são aquelas que têm indicação de tratamento cirúrgico conservador para a neoplasia mamária. Dessa forma, possuem baixa concentração de células tumorais nas mamas após o tratamento cirúrgico, recebem o enxerto gorduroso no âmbito da glândula mamária, possuem tumores de estadiamento baixo e, principalmente, recebem gordura como um todo e não células-tronco isoladas.

Esse último fato, por si só, levanta uma reflexão vital: ainda que o tecido gorduroso possua as células-tronco entre seus componentes, o efeito dessas

isoladamente e quando contidas na complexidade tecidual pode ser absolutamente diverso. Como demonstrado no estudo de WATERMAN *et al.* (2012), as células-tronco têm o riquíssimo potencial de responder a diferentes estímulos com comportamentos biológicos distintos, por vezes julgados contraditórios. Desse modo, não é coerente condenar o uso do enxerto de gordura na reconstrução de mama pelo fato de células-tronco do tecido adiposo apresentarem *in vitro* e *in vivo* o potencial de aumentar a proliferação e a disseminação de tumores mamários. O comportamento dessas células na intimidade do tecido adiposo pode ser modulado de forma diferente e, apesar das relações parácrinas e endócrinas dos adipócitos promovendo estímulo ao crescimento tumoral apontadas por BIELLI *et al.* (2014), o efeito final do enxerto de gordura composto por adipócitos, ASCs e mais uma variedade de outras subpopulações celulares e componentes extracelulares, pode ser desfavorável ao crescimento e à progressão tumoral, como demonstrado no presente estudo. Na realidade, devem-se direcionar esforços para o estudo da interação do câncer de mama com enxerto de gordura como um todo e com a fração estromal vascular, componente do tecido adiposo cujo uso clínico é permitido.

No presente estudo, todo o delineamento foi realizado no sentido de produzir em animal de experimentação um cenário clinicamente relevante: tumores formados a partir de apenas 1.000 células, simulando possíveis recidivas decorrentes de remanescentes microscópicos de tumor após cirurgia conservadora; tumores compostos de células MCF7, linhagem celular de perfil molecular semelhante ao mais prevalente tipo de tumor mamário; xenoenxerto tumoral e intervenção com lipoenxertia realizados na intimidade do tecido mamário, permitindo que os fenômenos biológicos ocorressem dentro da complexidade tecidual; intervenção com enxerto gorduroso, procedimento amplamente utilizado e difundido, em vez da aplicação de células-tronco do tecido adiposo isoladas e manipuladas em cultura, o que não é permitido clinicamente pela legislação de vários países, incluindo Brasil e Estados Unidos;

enxerto de gordura após a formação tumoral ao invés da aplicação simultânea de células tumorais e gordurosas, o que permite ao tumor formar-se e iniciar o crescimento sem a interferência do tecido adiposo; e o uso de células tumorais e adiposas de origem humana.

Nesse novo modelo proposto, com características clinicamente relevantes, neoplasias mamárias submetidas ao enxerto de gordura adjacente como intervenção não se mostraram maiores, mais pesadas, mais proliferativas, mais metastáticas ou de pior grau histológico comparadas às que receberam injeção de solução salina adjacente. Demonstra-se, portanto, que um modelo experimental pautado nos princípios da medicina translacional, apesar de distanciar-se da maioria dos resultados experimentais prévios, aproxima-se dos estudos clínicos, que não fornecem até o momento evidências de relação do enxerto gorduroso com pior evolução das pacientes.

A busca de um modelo experimental ideal para o estudo da segurança oncológica da lipoenxertia em sítios de tumor mamário, assim como a busca de um modelo ideal para o estudo da neoplasia mamária, é inesgotável. Conforme já destacou WAGNER (2003), o câncer de mama, por seu caráter genético e fenotípico heterogêneo, não é passível de retrato fidedigno por um único modelo animal. A própria definição de “modelo” provém do latim *modulus* e significa “pequena medida”. No entanto, não pode residir nessa dificuldade um motivo para abandonar ou desvalorizar a pesquisa pré-clínica. Deve haver, na realidade, a tentativa, como no presente estudo, de elaborar um modelo animal ideal para o estudo de cada situação particular no cenário do câncer de mama. De modo que o modelo represente certas características peculiares a serem estudadas, mas sejam reconhecidas as suas limitações e evitadas extrapolações ou generalizações. A superioridade de um modelo experimental depende da hipótese a ser estudada, do delineamento experimental e do tipo de estudo a ser desenvolvido.

É fundamental na elaboração de um modelo experimental, manter em mente o conceito da Pesquisa Translacional. Como destacaram PICKERING *et al.* (2015), ao invés da tradicional dicotomia entre a pesquisa básica experimental e a pesquisa clínica, a integração entre essas deve se dar desde a concepção dos estudos. Portanto, as observações clínicas, as imagens e os produtos obtidos de pacientes devem retornar à bancada do laboratório para análise e para orientar o refinamento de novas estratégias, métodos e modelos experimentais. Apesar das dificuldades do estabelecimento de ambientes universitários que propiciem a realização desse tipo de cooperação, a formação de equipes multidisciplinares e o estabelecimento de Programas de pós-graduação em Pesquisa Translacional, como o de Cirurgia Translacional, da Universidade Federal de São Paulo, representam um grande avanço nesse sentido.

Diante dos resultados do presente estudo, perspectivas são abertas para futuras investigações. A repetição do mesmo modelo experimental de lipoenxertia em sítio de neoplasia mamária residual utilizando células primárias de tumores representaria a heterogeneidade das populações celulares constituintes do câncer de mama. Embora as linhagens celulares sejam importantes para o estabelecimento inicial do modelo devido ao seu comportamento biológico mais homogêneo, um claro avanço seria partir para o uso de tumores primários. Certamente, dificuldades em relação à obtenção de amostras de tumores humanos e manutenção de número suficiente de células primárias em cultura, e resultados possivelmente heterogêneos representarão obstáculos à execução e à interpretação dos resultados dos próximos estudos.

O uso de animais imunossuprimidos em experimentos de xenoenxertos, embora represente o modelo padrão atual, leva a uma visão limitada das interações tumorais com o estroma e com as células do tecido adiposo. Devido à importância do sistema imunológico no desenvolvimento e na progressão tumoral, espera-se que o estudo em animais imunocompetentes possa render

resultados diversos dos apresentados no presente experimento. Neste caso particular, a prioridade de utilizar células humanas, tanto da neoplasia mamária quanto do tecido adiposo, foi o fator determinante para a escolha dos camundongos imunossuprimidos, capazes de tolerar a presença dessas células heterólogas em seu organismo.

Além disso, o uso de um controle com efeito de massa seria importante no prosseguimento do estudo da interação do enxerto de gordura com o câncer de mama. A solução salina utilizada neste modelo experimental é capaz de difundir-se pelos tecidos e é absorvida para a circulação sanguínea do animal, não exercendo, portanto, nenhum efeito a longo prazo no sítio submetido à injeção. O enxerto de gordura, por sua vez, foi detectado nas necropsias seis semanas após a intervenção e demonstrou-se capaz de permanecer adjacente ao tumor nos sítios enxertados, exercendo efeito de massa localmente em longo prazo, podendo resultar na redução de perfusão local, entre outros efeitos. Controles com ação mecânica como preenchedores, matriz dérmica acelular ou enxerto dérmico devem ser testados neste modelo a fim de confirmar ou descartar o protagonismo do efeito de compressão mecânica dos enxertos de gordura sobre os tumores como fator de redução de seu volume e proliferação.

Uma vez que a lipoenxertia na reconstrução de mama não seja compreendida como fator de risco para a recidiva local e disseminação da neoplasia mamária, ela pode ser aventada como possível sistema de transporte de drogas. Em alguns novos modelos experimentais, citados em FEISS *et al.* (2015), o enxerto de gordura e as ASCs têm sido usados como transportadores de diversos fármacos, incluindo quimioterápicos e fatores de crescimento. A habilidade de migrar e localizar-se nas proximidades de tumores e áreas de atividade inflamatória, tem rendido às ASCs um riquíssimo potencial também no âmbito terapêutico das neoplasias.

O presente estudo contribui para sustentar a incapacidade de o enxerto de gordura causar piora de prognóstico à neoplasia mamária quando utilizado como modalidade de reconstrução mamária, mesmo na presença de remanescentes tumorais. A partir dessa constatação, é possível passar a considerar o enxerto de gordura como um possível método terapêutico, como carreadores agentes terapêuticos para controle local do câncer de mama ou mesmo como modulador de fenômenos biológicos envolvidos no crescimento e na progressão tumoral.

CONCLUSÃO

7. CONCLUSÃO

A lipoenxertia não demonstrou impacto negativo sobre as características macroscópicas ou microscópicas de tumores malignos da mama num modelo experimental de neoplasia residual em camundongos.

REFERÊNCIAS

8. REFERÊNCIAS

Agha RA, Fowler AJ, Herlin C, Goodacre TE, Orgill DP. Use of autologous fat grafting for breast reconstruction: a systematic review with meta-analysis of oncological outcomes. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. 2015 Feb;68(2):143-61.

Aguiar IC, Veiga DF, Marques TF, Novo NF, Sabino Neto M, Ferreira LM. Patient-reported outcomes measured by BREAST-Q after implant-based breast reconstruction: A cross-sectional controlled study in Brazilian patients. *Breast*. 2017 Feb;31:22-5.

Amar O, Bruant-Rodier C, Lehmann S, Bollecker V, Will A. Fat tissue transplant: restoration of the mammary volume after conservative treatment of breast cancers, clinical and radiological considerations. *Ann Chir Plast Esth*. 2008;53(2):169-77.

ASPS. Post-Mastectomy Fat Graft/Fat Transfer ASPS Guiding Principles. [Internet]. 2015 [cited 2017 April 7]. Available from: <https://www.plasticsurgery.org/Documents/Health-Policy/Principles/principle-2015-post-mastectomy-fat-grafting.pdf>

ASPRS. Report on Autologous Fat Transplantation. ASPRS Ad-Hoc Committee on New Procedures, September 30, 1987. *Plast Surg Nurs*. 1987;7:140-1.

Barteneva NS, Ketman K, Fasler-Kan E, Potashnikova D, Vorobjev IA. Cell sorting in cancer research-diminishing degree of cell heterogeneity. *Biochim Biophys Acta*. 2013 Aug;1836(1):105-22.

Bertolini F, Petit JY, Kolonin MG. Stem cells from adipose tissue and breast cancer: hype, risks and hope. *Br J Cancer*. 2015 Feb 3;112(3):419-23.

Bielli A, Scioli MG, Gentile P, Agostinelli S, Tarquini C, Cervelli V, *et al*. Adult adipose-derived stem cells and breast cancer: a controversial relationship. *Springerplus*. 2014 Jul 8;3:345.

Bloom HJ, Richardson WW. Histological grading and prognosis in breast cancer; a study of 1409 cases of which 359 have been followed for 15 years. *Br J Cancer*. 1957 Sep;11(3):359-77.

- Bottini A, Berruti A, Bersiga A, Brizzi MP, Bruzzi P, Aguggini S, *et al.* Relationship between tumour shrinkage and reduction in Ki67 expression after primary chemotherapy in human breast cancer. *Br J Cancer*. 2001 Oct 19;85(8):1106-12.
- Brenelli F, Rietjens M, De Lorenzi F, Pinto-Neto A, Rossetto F, Martella S, *et al.* Oncological safety of autologous fat grafting after breast conservative treatment: a prospective evaluation. *Breast J*. 2014 Mar-Apr;20(2):159-65.
- Burdall SE, Hanby AM, Lansdown MR, Speirs V. Breast cancer cell lines: friend or foe? *Breast Cancer Res*. 2003;5(2):89-95.
- Charvet HJ, Orbay H, Wong MS, Sahar DE. The oncologic safety of breast fat grafting and contradictions between basic science and clinical studies: a systematic review of the recent literature. *Ann Plast Surg*. 2015 Oct;75(4):471-9.
- Cheng G, Tse J, Jain RK, Munn LL. Micro-environmental mechanical stress controls tumor spheroid size and morphology by suppressing proliferation and inducing apoptosis in cancer cells. *PLoS One*. 2009;4(2):e4632.
- Cho U, Kim HE, Oh WJ, Yeo MK, Song BJ, Lee A. The long-term prognostic performance of Ki-67 in primary operable breast cancer and evaluation of its optimal cutoff value. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2016 Mar;24(3):159-66.
- Coleman SR. Long-term survival of fat transplants: controlled demonstrations. *Aesthetic Plast Surg*. 1995 Sep-Oct;19(5):421-5.
- Coleman SR. Structural fat grafting: more than a permanent filler. *Plast Reconstr Surg*. 2006 Sep;118(3 Suppl):108S-20S.
- Czerny, V. Plastischer Ersatz der Brustdrüse durch ein Lipom. *Chir Kong Verhandl*. 1895;2:216.
- Delay E, Gosset J, Toussoun G, Delaporte T, Delbaere M. Efficacy of lipomodelling for the management of sequelae of breast cancer conservative treatment. *Ann Chir Plast Esth*. 2008;53(2):153-68.
- De Decker M, De Schrijver L, Thiessen F, Tondu T, Van Goethem M, Tjalma WA. Breast cancer and fat grafting: efficacy, safety and complications-a systematic review. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2016 Dec;207:100-108.

Devarajan E, Song YH, Krishnappa S, Alt E. Epithelial-mesenchymal transitioning breast cancer lines is mediated through PDGF-D released by tissue-resident stem cells. *Int J Cancer*. 2012 Sep 1;131(5):1023-31.

Dirat B, Bochet L, Dabek M, Daviaud D, Dauvillier S, Majed B, *et al*. Cancer-associated adipocytes exhibit an activated phenotype and contribute to breast cancer invasion. *Cancer Res*. 2011 Apr 1;71(7):2455-65.

Donnenberg VS, Zimmerlin L, Rubin JP, Donnenberg AD. Regenerative therapy after cancer: what are the risks? *Tissue Eng Part B Rev*. 2010 Dec;16(6):567-75.

Ellis PA, Makris A, Burton SA, Titley J, Ormerod MG, Salter J, *et al*. Comparison of MIB-1 proliferation index with S-phase fraction in human breast carcinomas. *Br J Cancer*. 1996 Mar;73(5):640-3.

Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology*. 1991 Nov;19(5):403-10.

Eltahir Y, Werners LL, Dreise MM, van Emmichoven IA, Jansen L, Werker PM, *et al*. Quality-of-life outcomes between mastectomy alone and breast reconstruction: comparison of patient-reported BREAST-Q and other health-related quality-of-life measures. *Plast Reconstr Surg*. 2013 Aug;132(2):201e-9e.

Eltahir Y, Werners LL, Dreise MM, Zeijlmans van Emmichoven IA, Werker PM, de Bock GH. Which breast is the best? Successful autologous or alloplastic breast reconstruction: patient-reported quality-of-life outcomes. *Plast Reconstr Surg*. 2015 Jan;135(1):43-50.

Eterno V, Zambelli A, Pavesi L, Villani L, Zanini V, Petrolo G, *et al*. Adipose-derived Mesenchymal Stem Cells (ASCs) may favour breast cancer recurrence via HGF/c-Met signaling. *Oncotarget*. 2014 Feb 15;5(3):613-33.

FDA Update on the Safety of Silicone Gel-Filled Implants. Center for Devices and Radiological Health. [Internet]. 2011 [Cited 2017 Mar 29]. Available from: <http://www.fda.gov/downloads/medicaldevices/productsandmedicalprocedures/implantsandprosthetics/breastimplants/UCM260090.pdf>

Feiss V, Meidinger S, Locke MB. From bench to bedside: use of human adipose-derived stem cells. *Stem Cells Cloning*. 2015 Nov 2;8:149-62.

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 May;135(5):1263-75.

Gimble JM, Ray SP, Zanata F, Wade J, Khoobehi K, Wu X, *et al*. Adipose derived cells and tissues for regenerative medicine. *ACS Biomater Sci Eng*. 2016;3(8):1477-82.

Gutowski KA; ASPS Fat Graft Task Force. Current applications and safety of autologous fat grafts: a report of the ASPS fat graft task force. *Plast Reconstr Surg*. 2009 Jul;124(1):272-80.

Harris L, Fritsche H, Mennel R, Norton L, Ravdin P, Taube S, *et al*; American Society of Clinical Oncology. American Society of Clinical Oncology 2007 update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer. *J Clin Oncol*. 2007 Nov 20;25(33):5287-312.

Haybittle JL, Blamey RW, Elston CW, Johnson J, Doyle PJ, Campbell FC, *et al*. A prognostic index in primary breast cancer. *Br J Cancer*. 1982 Mar;45(3):361-6.

Holliday DL, Speirs V. Choosing the right cell line for breast cancer research. *Breast Cancer Res*. 2011 Aug 12;13(4):215.

Hovey RC, McFadden TB, Akers RM. Regulation of mammary gland growth and morphogenesis by the mammary fat pad: a species comparison. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 1999 Jan;4(1):53-68.

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 Sep;47(4):273-5.

Illouz YG. Body contouring by lipolysis: a 5-year experience with over 3000 cases. *Plast Reconstr Surg*. 1983 Nov;72(5):591-7.

Illouz YG, Sterodimas A. Autologous fat transplantation to the breast: a personal technique with 25 years of experience. *Aesthetic Plast Surg*. 2009 Sep;33(5):706-15.

INCA. Estimativa 2016: Incidência de câncer no Brasil. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/index.asp?ID=1>. Último Acesso em: 29/03/2017.

Jonat W, Arnold N. Is the Ki-67 labelling index ready for clinical use? *Ann Oncol.* 2011 Mar;22(3):500-2.

Jotzu C, Alt E, Welte G, Li J, Hennessy BT, Devarajan E, *et al.* Adipose tissue-derived stem cells differentiate into carcinoma-associated fibroblast-like cells under the influence of tumor-derived factors. *Ann Cell Pathol (Amst).* 2010;33(2):61-79.

Kapur SK, Katz AJ. Review of the adipose derived stem cell secretome. *Biochimie.* 2013 Dec;95(12):2222-8.

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.* 2016 Mar;76(3):270-5.

Kasem A, Wazir U, Headon H, Mokbel K. Breast lipofilling: a review of current practice. *Arch Plast Surg.* 2015 Mar;42(2):126-30.

Kilkenny C, Browne WJ, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG. Improving bioscience research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research. *PLoS Biol.* 2010 Jun 29;8(6):e1000412.

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 Jul;132(1):35-46.

Kokai LE, Traktuev DO, Zhang L, Merfeld-Clauss S, DiBernardo G, Lu H, *et al.* Adipose stem cell function maintained with age: an intra-subject study of long-term cryopreserved cells. *Aesthet Surg J.* 2017 Apr 1;37(4):454-463.

Kokuba EM, Sabino Neto M, Garcia EB, Bastos EM, Aihara AY, Ferreira LM. Functional capacity after pedicled TRAM flap delayed breast reconstruction. *J Plast Reconstr Aesthet Surg.* 2008 Nov;61(11):1394-6.

Kronowitz SJ, Mandujano CC, Liu J, Kuerer HM, Smith B, Garvey P, *et al.* Lipofilling of the breast does not increase the risk of recurrence of breast cancer: a matched controlled study. *Plast Reconstr Surg.* 2016 Feb;137(2):385-93.

Kucerova L, Kovacovicova M, Polak S, Bohac M, Fedeles J, Palencar D, *et al.* Interaction of human adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells with breast cancer cells. *Neoplasma.* 2011;58(5):361-70.

- 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 Nov 9;13:535.
- Lohsiriwat V, Curigliano G, Rietjens M, Goldhirsch A, Petit JY. Autologous fat transplantation in patients with breast cancer: "silencing" or "fueling" cancer recurrence? *Breast*. 2011 Aug;20(4):351-7.
- Neuber, G.A. Fettransplantation. *Chir Kongr Verhandl Deutsche Gesellschaft für Chirurgie*. 1893;22:66.
- Neto MS, de Aguiar Menezes MV, Moreira JR, Garcia EB, Abla LE, Ferreira LM. Sexuality after breast reconstruction post mastectomy. *Aesthetic Plast Surg*. 2013 Jun;37(3):643-7.
- Osborne CK, Hobbs K, Trent JM. Biological differences among MCF-7 human breast cancer cell lines from different laboratories. *Breast Cancer Res Treat*. 1987;9(2):111-21.
- 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.
- Peer LA. Loss of weight and volume in human fat grafts: with postulation of a "cell survival theory". *Plast Reconstr Surg* 1950;5(3):217-30.
- 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 May;38(5):382-9.
- Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, *et al*. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000 Aug 17;406(6797):747-52.
- 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 Aug;128(2):341-6.

- 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 Mar;23(3):582-8.
- 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 Jun;24(6):1479-84.
- Petit JY, Maisonneuve P, Rotmensz N, Bertolini F, Rietjens M. Fat grafting after invasive breast cancer: a matched case-control study. *Plast Reconstr Surg.* 2017 Jun;139(6):1292-6.
- Pickering CR, Bast RC Jr, Keyomarsi K. How will we recruit, train, and retain physicians and scientists to conduct translational cancer research? *Cancer.* 2015 Mar 15;121(6):806-16.
- Pinell-White XA, Duggal C, Metcalfe D, Sackeyfio R, Hart AM, Losken A. Patient-reported quality of life after breast reconstruction: a one-year longitudinal study using the WHO QOL survey. *Ann Plast Surg.* 2015a Aug;75(2):144-8.
- Pinell-White XA, Etra J, Newell M, Tuscano D, Shin K, Losken A. Radiographic implications of fat grafting to the reconstructed breast. *Breast J.* 2015b Sep-Oct;21(5):520-5.
- 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 Apr;64(4):477-83.
- 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 Apr 15;119(5):1409-22.
- Ritter A, Friemel A, Fornoff F, Adjan M, Solbach C, Yuan J, *et al.* Characterization of adipose-derived stem cells from subcutaneous and visceral adipose tissues and their function in breast cancer cells. *Oncotarget.* 2015 Oct 27;6(33):34475-93.
- 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 May;129(5):1029-38.

- Runowicz CD, Leach CR, Henry NL, Henry KS, Mackey HT, Cowens-Alvarado RL, *et al.* American Cancer Society/American Society of Clinical Oncology Breast Cancer Survivorship Care Guideline. *CA Cancer J Clin.* 2016 Jan;66(1):43-73.
- Ryu H, Oh JE, Rhee KJ, Baik SK, Kim J, Kang SJ, *et al.* Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells cultured at high density express IFN- β and suppress the growth of MCF-7 human breast cancer cells. *Cancer Lett.* 2014 Oct 1;352(2):220-7.
- Schaffler A, Scholmerich J, Buechler C. Mechanisms of disease: adipokines and breast cancer - endocrine and paracrine mechanisms that connect adiposity and breast cancer. *Nat Clin Pract Endoc.* 2007;3(4):345-54.
- Schweizer R, Tsuji W, Gorantla VS, Marra KG, Rubin JP, Plock JA. The role of adipose-derived stem cells in breast cancer progression and metastasis. *Stem Cells Int.* 2015;2015:120949.
- Senst C, Nazari-Shafti T, Kruger S, Höner Zu Bentrup K, Dupin CL, Chaffin AE, *et al.* Prospective dual role of mesenchymal stem cells in breast tumor microenvironment. *Breast Cancer Res Treat.* 2013 Jan;137(1):69-79.
- Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer Statistics, 2017. *CA Cancer J Clin.* 2017 Jan;67(1):7-30.
- Silva MMA, Donenberg VS, Rubin JP, Zimmerlin L, Donnenberg AD. The immune milieu of adipose tissue: implications for autologous lipotransfer and other therapeutic applications. In: Coleman S, Mazzola R, Pu L, editors. *Fat injection: from filling to regeneration.* 2nd ed. Boca Raton(FL):CRC Press. 2016:200-27.
- Skillman J, Hardwicke J, Whisker L, England D. Attitudes of U.K. breast and plastic surgeons to lipomodelling in breast surgery. *Breast.* 2013;22:1200-4.
- Société Française de Chirurgie Plastique Reconstructrice et Esthétique - SOFCPRE. 2012; Disponível em: <http://www.plasticiens-paris.com/2012/03/21/de-nouvelles-recommandations-pour-linjection-de-graisse-dans-les-seins/>. Acessado em: 15 ago. 2017.
- Soule HD, Vazquez J, Long A, Albert S, Brennan M. A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst.* 1973 Nov;51(5):1409-16.

Stylianopoulos T. The solid mechanics of cancer and strategies for improved therapy. *J Biomech Eng.* 2017 Feb 1;139(2).

Suartz CV, Gaiba S, França JP, Aloise AC, Ferreira LM. Adipose-derived stem cells (ADSC) in the viability of random skin flap in rats. *Acta Cir Bras.* 2014;29 Suppl 2:6-9.

Sun B, Roh KH, Park JR, Lee SR, Park SB, Jung JW, *et al.* Therapeutic potential of mesenchymal stromal cells in a mouse breast cancer metastasis model. *Cytotherapy.* 2009;11(3):289-98.

Sun Z, Wang S, Zhao RC. The roles of mesenchymal stem cells in tumor inflammatory microenvironment. *J Hematol Oncol.* 2014 Feb 6;7:14.

Tashima R, Nishimura R, Osako T, Nishiyama Y, Okumura Y, Nakano M, *et al.* Evaluation of an optimal cut-off point for the Ki-67 index as a prognostic factor in primary breast cancer: a retrospective study. *PLoS One.* 2015 Jul 15;10(7):e0119565.

Todd JH, Dowle C, Williams MR, Elston CW, Ellis IO, Hinton CP, *et al.* Confirmation of a prognostic index in primary breast cancer. *Br J Cancer.* 1987 Oct;56(4):489-92.

Tse JM, Cheng G, Tyrrell JA, Wilcox-Adelman SA, Boucher Y, Jain RK, *et al.* Mechanical compression drives cancer cells toward invasive phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012 Jan 17;109(3):911-6.

Veiga DF, Sabino Neto M, Ferreira LM, Garcia EB, Veiga Filho J, Novo NF, *et al.* Quality of life outcomes after pedicled TRAM flap delayed breast reconstruction. *Br J Plast Surg.* 2004 Apr;57(3):252-7.

Veronesi U, Cascinelli N, Mariani L, Greco M, Saccozzi R, Luini A, *et al.* Twenty-year follow-up of a randomized study comparing breast-conserving surgery with radical mastectomy for early breast cancer. *N Engl J Med.* 2002 Oct 17;347(16):1227-32.

Vona-Davis L, Rose DP. Adipokines as endocrine, paracrine, and autocrine factors in breast cancer risk and progression. *Endocr Relat Cancer.* 2007 Jun;14(2):189-206.

Wagner KU. Models of breast cancer: quo vadis, animal modeling? *Breast Cancer Res.* 2004;6(1):31-8.

Walter M, Liang S, Ghosh S, Hornsby PJ, Li R. Interleukin 6 secreted from adipose stromal cells promotes migration and invasion of breast cancer cells. *Oncogene*. 2009 Jul 30;28(30):2745-55.

Waterman RS, Henkle SL, Betancourt AM. Mesenchymal stem cell 1 (MSC1)-based therapy attenuates tumor growth whereas MSC2-treatment promotes tumor growth and metastasis. *PLoS One*. 2012;7(9):e45590.

Weichman KE, Broer PN, Thanik VD, Wilson SC, Tanna N, Levine JP, *et al.* Patient-reported satisfaction and quality of life following breast reconstruction in thin patients: a comparison between microsurgical and prosthetic implant recipients. *Plast Reconstr Surg*. 2015 Aug;136(2):213-20.

Yang JD, Huh JS, Min YS, Kim HJ, Park HY, Jung TD. Physical and functional ability recovery patterns and quality of life after immediate autologous latissimus dorsi breast reconstruction: a 1-year prospective observational study. *Plast Reconstr Surg*. 2015 Dec;136(6):1146-54.

Zanata F, Shaik S, Devireddy RV, Wu X, Ferreira LM, Gimble JM. Cryopreserved adipose tissue-derived stromal/stem cells: potential for applications in clinic and therapy. *Adv Exp Med Biol*. 2016;951:137-146.

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 Jan;17(1-2):93-106.

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 Apr;7(2):211-28.

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 Dec;13(12):4279-95.

NORMAS ADOTADAS

NORMAS ADOTADAS

Academia Brasileira de Letras. Vocabulário Ortográfico da Língua Portuguesa. 5 ed. São Paulo: Global, 2009. 976 p.

COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal) – Princípios éticos da experimentação animal. [citado 2017 Nov 11]. Disponível em: <http://www.meusite.com.br/cobea/index.htm>.

Descritores em Ciências da Saúde (Decs) [Internet]. São Paulo: Biblioteca Regional de Medicina (Bireme) - [citado 2017 Nov 11]. Disponível em: <http://decs.bvs.br/>

Ferreira LM, Petroianu A, Aloise AC, Hochman B, Brandt CT, Veiga DF, Furtado FMGP, Nahas FX, Campos JHO, Ely PB, Marques RG. Projetos, dissertações e teses: Orientação normativa. São Paulo: Red Publicações; 2017.

List of journals indexed for Medline. Washington: National Library of Medicine. 2005 Jun - [citado 2017 Nov 11]. Disponível em: <ftp://nlmpubs.nlm.nih.gov/online/journals/ljiweb.pdf>

Kilkenny C, Browne WJ, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG. Improving bioscience research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research. PLoS Biol. 2010 Jun 29;8(6):e1000412.

Nomina anatômica veterinária [Internet]. International Committee on Veterinary Gross Anatomical Nomenclature. 2012 – [citado 2017 Nov 11] 5. ed. Disponível em: http://www.wava-amav.org/Downloads/nav_2012.pdf

Normas para utilização de animais de laboratório na pesquisa e ensino na Unifesp [Internet]. São Paulo: Centro de Desenvolvimento de Medicina Experimental (Cedeme/Unifesp) - [citado 2017 Nov 11]. Disponível em: <http://www.unifesp.br/centros/cedeme/normas.htm>

Terminologia Anatômica. Terminologia Anatômica Internacional. São Paulo: Manole; 2001. 248 p.

Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journal. Writing and editing for biomedical publication [Internet]. Vancouver (CA): International Committee of Medical Journals Editors. 2007 - [citado 2017 Nov 11]. Disponível em: <http://www.icmje.org>

APÊNDICES

APÊNDICE 1 - IACUC (*Institutional Animal Care and Use Committee*)**Universidade de Pittsburgh****IACUC MODIFICATION APPROVAL****Principal Investigator: Protocol Title:****Additional Titles:****Funding Source(s): Modification Approval Date:**

To Whom It May Concern:

Protocol #: 15086677 Modification #: IML-15086677-1 PHS Assurance Number: A3187-01

J. Peter Rubin

Preadipocytes Seeded on Engineered Constructs to Form Vascularized Soft Tissue (2)

Injectable Engineered Tissue for Cancer Reconstruction
University of Pittsburgh Department of Surgery, Division of Plastic Surgery;
Musculoskeletal Transplant Foundation; DSM

8/27/2015

The University of Pittsburgh's Institutional Animal Care and Use Committee has reviewed and approved the research modification referenced above.

The committee finds that the modification meets the standards for humane animal care and use as set by the Animal Welfare Act and the NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals.

Sincerely,

Frank J. Jenkins, PhD

Institutional Animal Care and Use Committee

The protocol will be due for renewal : 8/31/2016**This modification approval does not change the approval date of the protocol.**

APÊNDICE 2 - Comitê de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de São Paulo



Ilmo(a). Sr(a).

Pesquisador(a): Mayara Mytzi De Aquino Silva Depto/Disc: Depto Cirurgia Disciplina Cirurgia Plástica Miguel Sabino Neto (orientador)

Título do projeto: "INTERAÇÃO MOLECULAR ENTRE ENXERTOS GORDUROSOS ENRIQUECIDOS COM CÉLULAS- TRONCO DO TECIDO ADIPOSEO E NEOPLASIA MAMÁRIA EM MODELO ANIMAL".

Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais UNIFESP/HSP

O câncer de mama é a segunda neoplasia mais comum em mulheres nos EUA e a primeira no Brasil, excluindo-se o câncer de pele. Com o aumento da sobrevivência das pacientes, a reconstrução de mama vem tendo um crescimento de demanda e os procedimentos de lipoenxertia estão entre os mais indicados. A gordura definitivamente não se trata de um preenchedor inerte. Ao contrário de preenchedores sintéticos, trata-se de tecido metabolicamente ativo e capaz de secretar hormônios, fatores de crescimento e citocinas. A atividade molecular e secretora do enxerto gorduroso é supostamente implicada nos seus resultados mais promissores, mas também consiste na fonte de maiores dúvidas sobre a sua segurança. As células-tronco derivadas do tecido adiposo tem atividade angiogênica e capacidade das primeiras de aumentar a proliferação e o potencial invasivo e metastático da neoplasia, e reduzir a apoptose de células tumorais. Num estudo recente de coorte histórica, pacientes com lesões intra-epiteliais que receberam lipoenxertia tiveram uma maior ocorrência de recidivas locais, principalmente nas cirurgias conservadoras do câncer do mama. Dessa forma, atualmente há uma necessidade premente pelo esclarecimento da interação molecular entre células-tronco derivadas de tecido adiposo e células epiteliais neoplásicas da mama. Somente a partir desse conhecimento será possível definir condições para seu uso oncológicamente seguro quanto ao tipo de neoplasia e o tipo de paciente candidata à reconstrução de mama.

ANIMAIS:

O estudo será realizado na Universidade de Pittsburgh (Pensilvania, EUA). Foi enviada carta de aprovação do estudo pelo Comitê de Ética local.

VIGÊNCIA:

início previsto para: setembro/2014 com término previsto para: julho/2015.



A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo, na reunião de 25/09/2014, **ANALISOU** e **APROVOU** todos os procedimentos apresentados neste protocolo.

1. Comunicar toda e qualquer alteração do protocolo.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do protocolo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.
4. **Relatórios parciais** de andamento deverão ser enviados **anualmente** à CEUA até a conclusão do protocolo.

São Paulo, 29 de setembro de 2014 CEUA N 9923060814.

Atenciosamente,

Prof. Dr. José Osmar Medina Pestana
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo

Rua Botucatu, 572, 1o andar conjunto 14 CEP 04023-061 São Paulo - tel: 55 (11) 5571-1062 /
fax: 55 (11) 5539-7162.

: e-mail:secretaria.cepunifesp@gmail.com CEUA No 9923060814.

APÊNDICE 3 - Estudo Piloto

Um estudo piloto foi realizado para cálculo amostral e teve seu delineamento elaborado em acordo com estudos prévios desenvolvidos no mesmo laboratório do Adipose Stem Cell Center em Pittsburgh, Estados Unidos.

Assim como no estudo principal, todos os cuidados e procedimentos realizados nos animais foram revisados e aprovados pelo *Institutional Animal Care and Committee* da Universidade de Pittsburgh (Pittsburgh, Pennsylvania, EUA) sob o número 1506677 (anexo I), e pelo Comitê de Ética em Uso de Animais da Universidade Federal de São Paulo, parecer número 9923060814 (anexo II).

Foram utilizados 15 sujeitos do tipo camundongos NOD-SCID gamma, com peso e idade semelhantes ao descrito no capítulo de Métodos. Os animais receberam xenoenxerto de células neoplásicas do tipo MCF7 em quatro sítios de suas glândulas mamárias, conforme descrito a seguir: superior direito - 0 células neoplásicas (apenas solução de transporte e Matrigel[®]); superior esquerdo - 10.000 células neoplásicas; inferior direito - 1.000 células neoplásicas; e inferior esquerdo - 100 células neoplásicas.

Após o xenoenxerto, os camundongos foram seguidos diariamente para avaliação de condição geral de saúde e palpação de tumores. Foi observado que, após 15 dias, 85% dos animais já possuíam tumores palpáveis; em quatro semanas, atingiu-se 100%.

Em 15 dias, foram realizadas intervenções no mesmo sítio do xenoenxerto em três grupos: controle (sem intervenção), sham (injeção de 100µl de solução salina) e lipo (injeção de 100µl de lipoaspirado humano preparado conforme a técnica de Coleman).

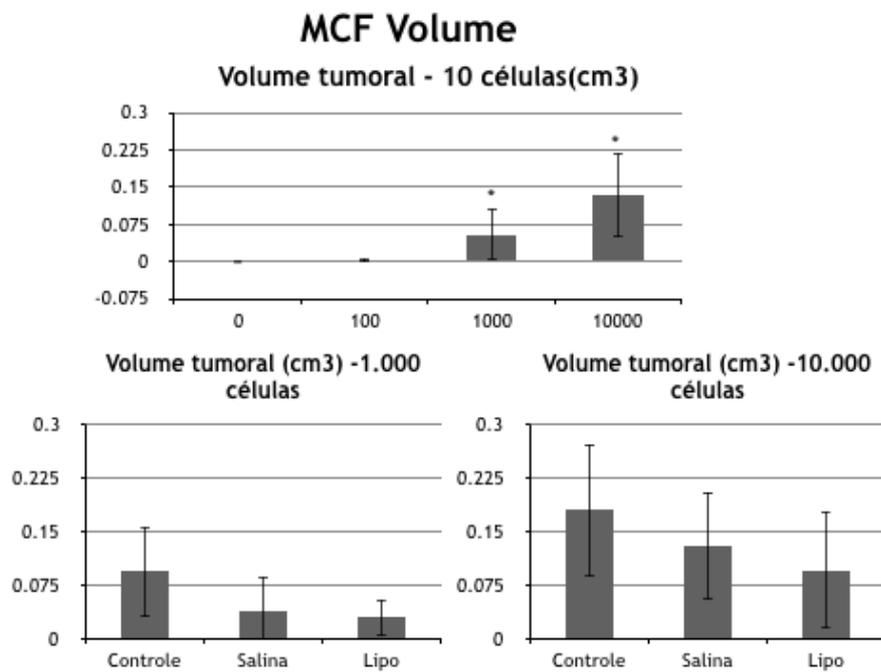
Os animais foram seguidos por oito semanas após a intervenção e submetidos à eutanásia e necropsia. Foi realizada análise de volume tumoral para o cálculo amostral.

Como resultados desse piloto e de experimentos prévios, destacam-se duas observações: não foi detectado nenhum tumor em sítio de injeção de 0 células neoplásicas, tornando claro que a solução de transporte e o Matrigel® não são capazes de gerar tumor isoladamente; e, em sítios de lipoenxertia, não houve formação de sarcomas ou outros tipos tumorais provenientes da gordura.

A dose de 10 células formou tumores palpáveis teve uma porcentagem de formação tumoral macroscópica errática, não atingindo 100% dos sítios. E a dose de 10.000 células formou tumores de grande volume, aproximando-se de 2cm, limite para eutanásia precoce e perda de animal de acordo com o protocolo do comitê de ética.

Quanto à análise de volume e cálculo amostral, os volumes tumorais apresentaram comportamento dose-dependente de acordo com o número de células injetadas. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os volumes dos três grupos de intervenção, mas houve uma tendência de os tumores do grupo lipo serem menores.

O cálculo amostral foi feito para obter um poder de 91,3% na detecção de diferenças do tamanho tumoral (volume) de uma vez e meia, correspondendo a uma diferença de aproximadamente 0,4 milímetros de diâmetro, com nível de significância de 0,05.



Volume tumoral em cm³ de animais submetidos a xenoinxerto com células MCF7. Acima, conforme a dose de células; e abaixo, conforme a intervenção nos grupos de 1.000 e 10.000 células. *p<0,05 compared to 0 cells group.

APÊNDICE 4 – Ficha individual dos animais

RO1 Project - Mice working sheet
Experiment: Tumor growth curve and Fat graft - MCF
Date:

Type of mice: _____

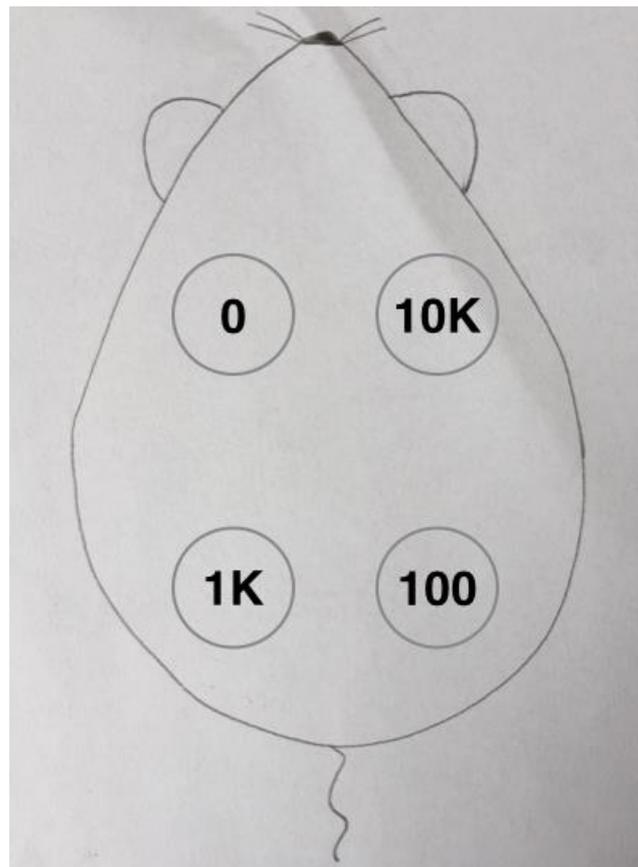
Initial Weight: _____

Final Weight: _____

Type of cancer cell: _____

Intervention: _____

Issues:



**APÊNDICE 5 - Documento de isenção de consentimento para
obtenção de material de descarte humano em cirurgias
*Institutional Review Board***



**University of Pittsburgh
Institutional Review Board**

Exempt and Expedited Reviews

University of Pittsburgh FWA: 00006790
University of Pittsburgh Medical Center: FWA 00006735
Children's Hospital of Pittsburgh: FWA 00000600

3500 Fifth Avenue
Suite 100
Pittsburgh, PA 15213
Phone: 412.383.1480
Fax: 412.383.1508

*Approved 12/22/05
SRB*

TO: Peter Rubin, MD
FROM: Sue R. Beers, Ph.D., Vice Chair *Sue R. Beers*
DATE: 12/22/05
PROJECT: Cultured Preadipocytes as a Model for Soft Tissue Engineering
IRB Number: 0511186

The above-referenced protocol has been reviewed by the University of Pittsburgh Institutional Review Board. Based on the information provided to the IRB, this project includes no involvement of human subjects, according to the federal regulations [§46.102(f)]. That is, the investigator conducting research will not obtain data through intervention or interaction with the individual, or will not obtain identifiable private information. Should that situation change, the investigator must notify the IRB immediately.

Given this determination, you may now begin your project.

SRB:tmr

FONTES CONSULTADAS

FONTES CONSULTADAS

Altman DG. Practical statistics for medical research. London: Chapman & Hall;1991.

Breast Cancer Resource Book. [Internet]. Manassas (VA): ATCC. - [citado 2017 Nov 11]. Disponível em:
https://www.atcc.org/~media/PDFs/Culture%20Guides/breast_cancer_resource.ashx

Comitê de Ética em Pesquisa [Internet]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo (Unifesp). - [citado 2017 Nov 11]. Disponível em:
<http://www.unifesp.br/reitoria/orgaos/comites/etica/>

Curso de manipulação de animais em laboratório [Internet]. Salvador (BA): Fundação Oswaldo Cruz. 2005 - [citado 2017 Nov 11]. Disponível em:
http://www.cpqgm.fiocruz.br/arquivos/bioterio_apostilha.pdf

Donnenberg A. Statistics of immunological testing. In: Donnenberg A, editor. Handbook of Human Immunology. 2 ed. Boca Raton: CRC Press; 2008. p. 29-62.

Hochman B, Nahas FX, Ferreira LM. Fotografia aplicada na pesquisa clínico-cirúrgica. Acta Cir Bras. 2005;20(supl.2):19-25.

Hochman B, Nahas FX, Oliveira Filho RS, Ferreira LM. Desenhos de pesquisa. Acta Cir Bras. 2005;20(supl.2):2-9.

Mazzola RF, Mazzola IC. History of fat grafting: from ram fat to stem cells. Clin Plast Surg. 2015 Apr;42(2):147-53;

Princípios éticos no uso de animais de laboratório [Internet]. Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório - Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (SBCAL-COBEA). [citado 2017 Nov 11]. Disponível em:
http://www.cobea.org.br/index.php?option=com_content&view=article&id=102&Itemid=119????

Thawing, propagating and cryopreserving protocol MCF7. [Internet]. Manassas (VA): ATCC. - [citado 2017 Nov 11]. Disponível em: https://physics.cancer.gov/docs/bioresource/breast/NCI-PBCF-HTB22_MCF7_SOP-508.pdf