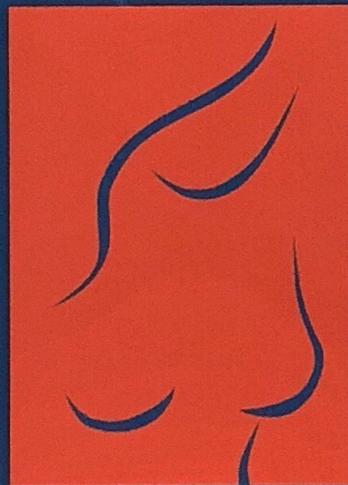




VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA

Facultad de Medicina Y Odontología
Departamento de Cirugía



RECONSTRUCCIÓN MAMARIA INMEDIATA MEDIANTE GRASA AUTÓLOGA TRAS TUMORECTOMÍA DE MAMA

Tesis Doctoral presentada por:
Roberto Moltó García

Dirigida por:
Prof. Eduardo García Granero
Dra. Edurne Novella Maestre
Dr. Francisco Ripoll Orts

Valencia, 2017



VNIVERSITATIS VALÈNCIA

Facultad de Medicina Y Odontología
Departamento de Cirugía

RECONSTRUCCIÓN MAMARIA INMEDIATA MEDIANTE GRASA AUTÓLOGA TRAS TUMORECTOMÍA DE MAMA

Tesis Doctoral presentada por:

Roberto Moltó García

Dirigida por:

Prof. Eduardo García Granero

Dra. Edurne Novella Maestre

Dr. Francisco Ripoll Orts

Valencia, 2017



La presente Tesis Doctoral ha sido realizada en los laboratorios de investigación del Instituto de Investigación Sanitaria La Fe (IIS-La Fe), en el Centro de Investigación Príncipe Felipe (CIPF) y en el Hospital Universitario y Politécnico La Fe.

4.3.- Implicaciones biológicas de las células mesenquimales indiferenciadas y su posible repercusión para su uso clínico.....	49
4.3.1.- Introducción	49
4.3.2.- Secreción de citoquinas.	53
4.3.3.- Cambios en la expresión fenotípica antigénica superficial.....	56
4.3.4.- Sobreexpresión génica.....	57
5. TÉCNICA QUIRÚRGICA DEL INJERTO DE TEJIDO ADIPOSO.....	60
6. HALLAZGOS Y COMPLICACIONES EN LA TÉCNICA DE INJERTOS GRASOS	66
7. NECESIDAD DE CONOCIMIENTO EXHAUSTIVO DE LA RADIOLOGÍA DE LA MAMA INJERTADA.....	71
7.1.- Introducción.....	71
7.2.- Seguimiento de los pacientes con injertos grasos.	73
8. TÉCNICA QUIRÚRGICA EN CASO DE RECONSTRUCCIÓN MAMARIA INMEDIATA.....	74

II. JUSTIFICACIÓN 75

III. HIPÓTESIS 83

IV. OBJETIVOS 86

1. OBJETIVO PRINCIPAL. 88

2. OBJETIVOS SECUNDARIOS. 88

V. MATERIALES Y MÉTODOS 91

1. EFECTO DEL TA EN EL DESARROLLO DE METÁSTASIS EN CM. 92

1.1.- Selección de pacientes..... 92

1.2.- Recogida y procesamiento de muestras. 95

1.3.- Preparación de la línea celular MDA-MB-468. 99

1.3.1.- Cultivo. 99

1.3.2.- Marcaje celular. 100

1.4.- Modelo animal de CM..... 105

1.4.1.- Cirugía. 106

1.4.2.- Monitorización de las células inyectadas en los ratones. 107

1.4.3.- Análisis de la invasión metastática post-mortem. 109

1.5.- Estudios inmunohistológicos..... 110

1.5.1.- Fijación. 110

1.5.2.- Lavado. 111

1.5.3.- Aclaramiento.....	111
1.5.4.- Inclusión.....	112
1.5.5.- Corte.....	113
1.5.6.- IHC.....	113
1.5.7.- Observación y fotografía.....	114
1.6.- Estudios moleculares.....	115
1.6.1.- Extracción de ARNm.....	115
1.6.2.- Análisis de la concentración del ARN.....	116
1.6.3.- Retrotranscripción.....	117
1.6.4.- PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR).....	118
1.7.- Análisis estadístico.....	127
2. DESARROLLO LA TÉCNICA QUIRÚRGICA DE RECONSTRUCCIÓN CON GRASA AUTÓLOGA TRAS TUMERECTOMÍA DE MAMA.....	128
2.1.- Selección de pacientes.....	128
2.2.- Recogida y procesamiento de muestras.....	130
2.3.- Protocolo quirúrgico.....	132
2.3.1.- Protocolo quirúrgico y desarrollo de técnica quirúrgica personal.	132
2.4.- Seguimiento de las pacientes.....	139
2.4.1.- Seguimiento radiológico.....	139

VI. RESULTADOS.....141

1.- EFECTO DEL TA EN EL DESARROLLO DE METÁSTASIS EN CM....	143
1.1.- Tasa de supervivencia.....	143
1.2.- Examen macroscópico.....	144
1.3.- Estudio del desarrollo metastásico in vivo.....	146
1.4.- Detección de micrometástasis por estudios moleculares.....	147
1.5.- Confirmación metastásica por estudios de expresión proteica.....	151
2.- RESULTADOS DEL ESTUDIO CLÍNICO DE RECONSTRUCCIÓN MAMARIA INMEDIATA TRAS TUMORECTOMÍA DE MAMA MEDIANTE AUTOINJERTOS GRASOS.....	154
2.1.- Análisis descriptivo de la situación de las pacientes pre-cirugía.....	154
2.2.- Análisis de las complicaciones quirúrgicas.....	156
2.2.1.- Complicaciones quirúrgicas en función de la edad de la paciente ...	157

2.2.2. - Complicaciones quirúrgicas en función de la adyuvancia	158
2.3. - Análisis de recidivas	160
2.4. - Resultados de los estudios radiológicos.	160
2.5. - Análisis de grado de satisfacción	174
2.5.1.- Grado de satisfacción estética.	174
2.5.2.- Grado de satisfacción de las pacientes.	180
VII. DISCUSIÓN.....	182
1.- DISCUSIÓN TRABAJO EXPERIMENTAL	184
2.- DISCUSIÓN DEL TRABAJO CLÍNICO	188
2.1. - Discusión de las ventajas de la reconstrucción autóloga frente a las prótesis.....	191
2.2. - Inconvenientes del uso de colgajos autólogo tipo DIEP y otros para corrección de defectos parciales.....	193
2.3. – Discusión sobre la cirugía oncoplastica.....	205
2.4. – Discusión de la seguridad de los injertos grasos	208
VIII.CONCLUSIONES	229
IX. BIBLIOGRAFÍA	233

:: AGRADECIMIENTOS

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis Doctoral, como supongo todas las que se presentan, constituye un complejo equilibrio entre esfuerzo e ilusión. En mi caso siendo mucha la ilusión no ha sido menos el esfuerzo, sobre todo por la etapa tan ajetreada en la que ha llegado a mi vida, junto a cosas tan distintas como el matrimonio, la doble paternidad y el cambio de trabajo de domicilio, e incluso de ciudad.

Por tanto, a los elementos externos de la misma, voy a poner en un lugar destacado de mi gratitud sincera.

A mi esposa Amparo, que ha tenido que arreglárselas con más trabajo del que le tocaba porque su marido estaba escribiendo en el ordenador este trabajo, y porque de ella solo he escuchado palabras de ánimo.

A mis hijos Álvaro y Roberto, porque me hubiera gustado en esta etapa tan bonita de nuestras vidas estar un poquito más de tiempo a su lado.

Del ámbito laboral ha habido mucha, mucha gente que ha echado un cable. Los residentes que cuando podían me ayudaban a las cirugías, los residentes mayores que me sustituyeron cuando hizo falta, y en general a todos mis compañeros del servicio de Cirugía Plástica del Hospital La

Fe, que me liberaron para que en el seno de la unidad de mama se realizara este trabajo.

Al personal de la Unidad de Mama de La Fe, desde el jefe a todos sus compañeros médicos que realizaron las cirugías conmigo y de los que debo decir que es difícil encontrar tan excelentes profesionales cuyo trato sea a la vez tan humano y agradable, con el paciente y con los compañeros .

También debo mucho al servicio de radiología del Hospital La Fe, que ha realizado una magnífica labor en cantidad y en calidad en las pruebas radiológicas realizadas a nuestras pacientes.

Al personal de mi consulta privada, que se tuvieron que arreglar sin jefe a ratos porque este estaba en estas labores, y especialmente a mi secretaria Ana que ha pasado muchos ratos libres sentada en el ordenador revisando y ordenando textos.

Y por último, a mis tres magníficos directores: el Profesor Eduardo García Granero, y los Doctores Francisco Ripoll y Edurne Novella, (cerebro pensante de la parte experimental de este trabajo), de los que solo he encontrado buenas ideas, sabias sugerencias y cariñosas palabras de ánimo y aliento.

:: ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

AC: adriamicina (doxorubicina) y ciclofosfamida

ACD: adriamicina (doxorubicina), ciclofosfamida y docetaxel

AC-t/D: adriamicina (doxorubicina), ciclofosfamida y taxol/docetaxel

ACT: adriamicina (doxorubicina), ciclofosfamida y taxol

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADNc: ácido desoxirribonucleico complementario

ARN: ácido ribonucleico

ARNm: ácido ribonucleico mensajero

BSA: suero albúmina bovina

CDI: carcinoma ductal infiltrante

CDIS: carcinoma ductal in situ

CIS: carcinoma in situ

CLIS: carcinoma lobular in situ

CM cáncer de mama

CMF: ciclofosfamida, metotrexatoy fluorouracilo

CO₂: dióxido de carbono

Ct: ciclo umbral

DEPC: dietilpirocarbonato

DMEM: medio Eagle modificado Dulbecco

DMSO: dimetilsulfóxido

dNTPs: dioxinucleótidos trifosfato

EDTA: etilendiamino tetracético

EGFR-2 (ERBB2): receptor del factor de crecimiento epidérmico

F: fungizona

FAC: fluorouracilo, adriamicina (doxorubicina), y ciclofosfamida

FACT: fluorouracilo, adriamicina (doxorubicina), ciclofosfamida y taza

FAM: carboxi-fluoresceína

FEC: fluorouracilo, epirubicino y ciclofosfamida

Gy: gray

H-E: hematoxilina-eosina

IHQ: inmunohistoquímica

IVIS: sistema de imagen in vivo (“In vivo imaging system”)

MGB: amortiguador de fluorescencia “*minor groove binder*”

MMLV: leucemia murina de Molowny

N₂: nitrógeno líquido

O₂: oxígeno

PBS: tampón fosfato salino

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

P-S: penicilina-estreptomicina

QT: quimioterapia

r.p.m.: revoluciones por minuto

ROI: regiones de interés

RT: radioterapia

RT-qPCR: reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa a tiempo real

SBEM: small breast epithelial mucin-1

SBF: suero bovino fetal

SE: desviación estándar

SPF: área de bioseguridad libre de patógenos

TA: tejido adiposo

:: INTRODUCCIÓN

I.- INTRODUCCIÓN

1. Cáncer de mama.

1.1. Definición.

Según la definición de la OMS, el cáncer es un término genérico que designa un amplio grupo de enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del organismo; también se habla de «tumores malignos» o «neoplasias malignas». Una característica del cáncer es la multiplicación rápida de células anormales que se extienden más allá de sus límites habituales y pueden invadir partes adyacentes del cuerpo o propagarse a otros órganos, proceso conocido como metástasis. Las metástasis son la principal causa de muerte por cáncer (OMS, Febrero 2015).

El cáncer de mama (CM) es el tumor maligno que se origina en el tejido de la glándula mamaria, como consecuencia de la proliferación acelerada e incontrolada de células del epitelio glandular. Se trata de una enfermedad heterogénea con distintas morfologías, desarrollo metastásico y respuesta terapéutica.

1.2. Epidemiología.

El CM es el cáncer más frecuente en las mujeres tanto en los países desarrollados como en los países en desarrollo, representando el 16% de todos los cánceres femeninos. Se estima que en 2004 murieron 519000 mujeres por CM (OMS,

Febrero 2015). En el año 2008 se diagnosticaron aproximadamente 1.380.000 casos nuevos de cáncer de mama en el mundo, incrementándose lentamente su incidencia debido al envejecimiento de la población y a un diagnóstico cada vez más precoz (aumento de la incidencia anual del 1-2%).

En España se diagnostican unos 26.000 casos al año, lo que representa casi el 30% de todos los tumores del sexo femenino en nuestro país. La mayoría de los casos se diagnostican entre los 35 y los 80 años, con un máximo entre los 45 y los 65.

En Estados Unidos, en el año 2016 se diagnosticaron 246.660 casos nuevos de CM, representando el 14,6% de todos los cánceres. De estos, se estiman 40.450 muertes, suponiendo el 6.8% de la totalidad de muertes por cáncer. (Figura 1) (Instituto Nacional del Cáncer 2016).

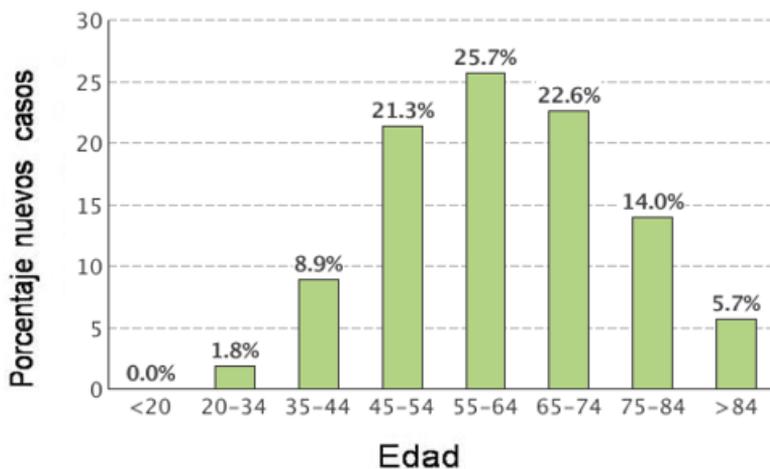


Figura 1. Porcentaje de casos nuevos de CM por rango de edades en EEUU. Se muestra el porcentaje de casos nuevos de CM según el rango de edad de las pacientes. El 10,7% de los casos diagnosticados de CM tienen menos de 44 años. La edad media del diagnóstico de CM es de 62 años (Instituto Nacional del Cáncer 2016).

La supervivencia media relativa del CM a los 5 años es del 89,7%. El estadio en el que se ha diagnosticado el cáncer influye en la supervivencia. El 61% de los casos de CM son de estadio I o localizado y el índice de supervivencia de este tipo es del 98,8%. El 31% de los casos son estadio II que incluye. El estadio II incluye:



Figura 2. Porcentaje de casos y de supervivencia por estadio del CM tras 5 años del diagnóstico. En la figura A se muestra el porcentaje de casos según el tipo de CM. En la figura B se muestra el porcentaje de supervivencia tras 5 años en los distintos tipos de CM (Instituto Nacional del Cáncer 2016).

1.3. Generalidades del Carcinoma infiltrante o invasivo.

Constituye una proliferación celular maligna que traspasa la frontera natural anatómica del ducto o el lobulillo, invadiendo el tejido circundante. Se trata de un grupo heterogéneo de tumores diferenciados por subtipos histológicos. Los principales tipos de tumores invasivos incluyen el carcinoma

ductal infiltrante (CDI), carcinoma lobular invasivo (CLI), medular, coloide y tubular. (Viale G. The current state of breast cancer classification. Ann Oncol. 2012).

- EL CDI se origina en las células que revisten los conductos galactóforos. Es el tipo más frecuente, representando el 80% de los cánceres infiltrantes de mama.

- El CLI: se originan en las células de los lobulillos mamarios. Su incidencia es mucho menor, del 10%.

2. Aspectos biológicos relevantes en el cáncer de mama.

2.1. Angiogénesis tumoral.

Al igual que las células normales las células tumorales necesitan oxígeno para sobrevivir, por lo que la vascularización de los tumores a través de los vasos sanguíneos procedentes del huésped influye de manera importante en el crecimiento del tumor. En los tumores de crecimiento rápido, la velocidad de éste suele superar a la de la vascularización, lo que se traduce en la aparición de áreas de necrosis isquémica. El crecimiento del tumor depende del equilibrio entre los factores angiogénicos y antiangiogénicos. Además, los vasos sanguíneos actúan como una ruta de movilización de células malignas a otros puntos del cuerpo del individuo (Khosravi Shahi P., Castillo Rueda A. del, Pérez

Manga G. Angiogénesis neoplásica. An. Med. Interna, Madrid 2008; 25 (7): 366-369).

2.2. Progresión tumoral.

La progresión tumoral se refiere al fenómeno por el que los tumores se van haciendo cada vez más agresivos y adquieren un potencial maligno progresivamente mayor. Se relaciona con la aparición secuencial en el interior del tumor de células que difieren en cuanto a su capacidad de infiltración, su velocidad de crecimiento, su capacidad para formar metástasis, su posibilidad de evitar la vigilancia inmunitaria y otras diversas características. Por tanto, un tumor clínicamente detectable, aunque de origen monoclonal, suele estar formado por una población celular fenotípicamente y genéticamente heterogénea. La heterogeneidad parece consecuencia de la inestabilidad genética de las células tumorales, que están sometidas a una elevada tasa de mutaciones aleatorias, posiblemente debida a la pérdida de p53, de los genes de reparación del DNA o de ambos. La heterogeneidad y la progresión de las células tumorales comienzan mucho antes de que los tumores sean clínicamente detectables (período de latencia) y persiste después de su descubrimiento clínico (Kastan MB. Biología Molecular del cáncer: el ciclo celular. En: VT DeVita, S Hellman, SA Rosenberg. Cáncer: Principios y práctica de oncología (5ª edición). Lippincott-Raven. Philadelphia, 1997; 121-134).

2.3. Mecanismo de invasión y metástasis.

La metástasis es la causa principal de mortalidad relacionada con el cáncer. Para que se produzca un foco de metástasis, las células tumorales deben adherirse a la matriz extracelular, degradarla y penetrar en ella en las diversas fases de la cascada metastásica.

Una vez en la circulación, se puede desarrollar una diseminación vascular en forma de émbolos, los cuales anidarán y producirán un crecimiento tumoral secundario. Esto dependerá de factores como el drenaje vascular y linfático de la localización primaria del tumor, la interacción entre las células tumorales y los receptores específicos de órgano, y el microambiente favorable o desfavorable del tejido diana (Vermeulen K, Van Bockstaele DR, Berneman ZN. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. Cell Prolif. 2003 Jun;36(3):131-49). (Figura 3).

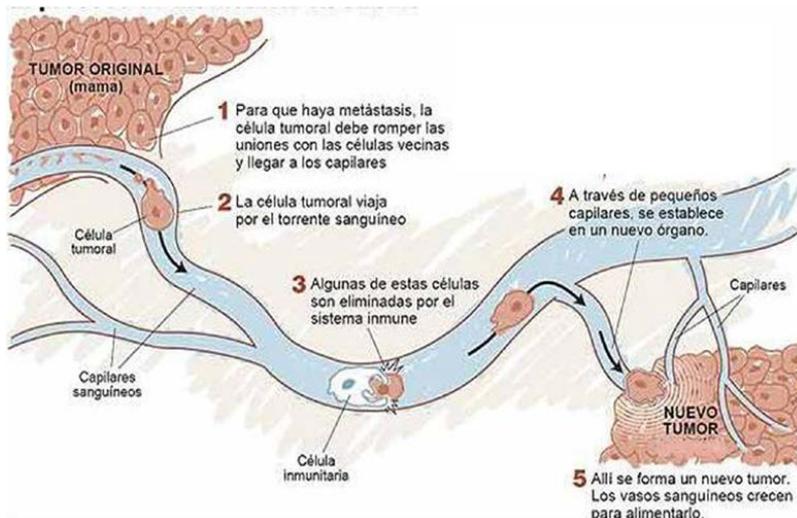


Figura 3. Esquema de proceso de metástasis. Se muestran el tumor primario en mama, desde él, las células tumorales trasvasan al torrente sanguíneo e invaden nuevos órganos distantes al tumor primario. En este proceso algunas células tumorales pueden ser eliminadas gracias a la acción del sistema inmunitario (Imagen modificada de "The New York Times").

3. Reconstrucción mamaria.

3.1. Introducción.

La reconstrucción de la mama es un componente esencial del tratamiento del cáncer de mama para muchas mujeres (Department of Health). Review of the Regulation of Cosmetic Interventions, 2013). Suele ser la parte optimista de un diagnóstico terrible. Las mujeres deciden someterse a una reconstrucción de la mama por distintos motivos, como no tener que necesitar una prótesis externa, menos limitaciones a la hora de vestirse, recuperar su feminidad y sentirse de nuevo completas. Otras deciden no someterse a la reconstrucción porque piensan que son demasiado mayores para la cirugía o temen sus complicaciones. Con la gran variedad de opciones en la reconstrucción de la mama son pocas las contraindicaciones absolutas para la reconstrucción y ésta se adapta perfectamente a los deseos de la paciente, así como a su estado de salud global. (Health and Social Care Information Centre. National Mastectomy and Reconstruction Audit, 2011; Lang JE y cols, 2013).

La reconstrucción mamaria consiste en restaurar el volumen perdido tras la cirugía resectiva, bien de forma inmediata en

la misma intervención quirúrgica de mastectomía o bien de forma diferida tras el final de los tratamientos radioquirúrgicos. Las técnicas quirúrgicas disponibles de reconstrucción son múltiples, y se clasifican como protésicas (prótesis definitivas o de expansión), colgajos (pediculados o microquirúrgicos) y técnicas mixtas que asocian un colgajo (dorsal ancho) y una prótesis.

El procedimiento quirúrgico de las técnicas protésicas es sencillo, ya que no se requiere una zona donante de extracción tisular, pero si son necesarias reintervenciones en el tiempo para cambiar la prótesis y lograr la continuidad de la simetría. El procedimiento quirúrgico de las técnicas de colgajos es más complejo, requiere un sitio donante, pero el resultado es más estable a lo largo del tiempo. Los sitios donantes empleados para simular el tejido mamario han ido evolucionando y perfeccionando a medida que han mejorado las posibilidades microquirúrgicas: región dorsal (colgajo de dorsal ancho con prótesis o autólogo), región abdominal (colgajo miocutáneo transversal del recto del abdomen, colgajo de perforantes de la arteria epigástrica inferior profunda, colgajo de la arteria epigástrica inferior superficial), región glútea (colgajos de perforantes de la arteria glútea inferior y superior), cara interna del muslo (colgajo miocutáneo transversal de músculo grácil). Cada técnica tiene sus ventajas y sus inconvenientes.

Las indicaciones de una técnica o otra se establecen en función de varios criterios. El estado de los tejidos en la zona mamaria es el elemento clínico principal que, de entrada, permite la reconstrucción protésica o, por el contrario, orienta hacia una reconstrucción autóloga. La morfología de la paciente y de su mama contralateral, la distribución de los excedentes tisulares, el estado general y el estado vascular son otros elementos clínicos que el cirujano debe sopesar frente a los deseos y a las prioridades expresadas por la paciente. Un gran dominio de la técnica por parte del cirujano y la escucha de los deseos de la paciente para que pueda tomar una decisión informada garantizan la satisfacción final, que es el objetivo esencial de la reconstrucción mamaria (Veronesi G y cols., 2007).

3.2. Técnicas reconstructivas.

Los procedimientos quirúrgicos tanto en reconstrucción diferida como en inmediata son básicamente los mismos. Procedimientos protésicos (implantes o expansores) y procedimientos mediante tejido autólogo.

En general en ambos escenarios (diferida vs. inmediata) si ha habido o va a haber RT se prefiere la reconstrucción con tejido autólogo. En ambos escenarios suele ser necesario la simetrización de la mama contralateral.

3.2.1. Diferida.

La reconstrucción se realizaba inicialmente sólo de forma diferida, respetando un período de varios meses después de los tratamientos oncológicos, pero en la actualidad, en algunos casos se puede realizar de inmediato, asociada a la mastectomía. De hecho, siempre que sea posible y la paciente así lo desee, se elige la reconstrucción inmediata porque no se ha demostrado que aumente el riesgo oncológico ni retrase el tratamiento complementario posquirúrgico, consiguiendo mejores resultados estéticos y beneficios psicológicos. (Pinsolle V y cols, 2006; Spear SL y cols, 2008).

Para la reconstrucción mamaria diferida siempre se realizará una mastectomía clásica con excisión de huso cutáneo asociada (no necesariamente) a un procedimiento axilar (biopsia ganglio centinela o vaciamiento axilar). En este caso el estado residual de la piel a la hora de la reconstrucción es más pobre, más adherido y menos distensible. Condiciones que se ven agravadas si además la paciente ha recibido radioterapia.

3.2.2. Inmediata.

La reconstrucción mamaria inmediata tiene la ventaja de que, si la localización del tumor lo permite (tumores lejos de la piel), se pueda llevar a cabo una mastectomía ahorradora de piel con unos resultados estéticos mejores y más parecidos a

su mama natural. Esta técnica puede conllevar un aumento del riesgo de necrosis de los colgajos cutáneos torácicos despegados, porque pueden desvascularizarse. Por ello, este procedimiento está contraindicado en las pacientes fumadoras o con antecedentes de tratamiento conservador previo. La radioterapia constituye una contraindicación para esta cirugía en algunos centros. El hecho de dejar más tejido glandular al preservar la piel mamaria no se traduce en una mayor recidiva local.

3.3. Opciones de reconstrucción: ventajas e inconvenientes.

El cirujano plástico es el único especialista en poseer la dualidad de conocer y dominar las técnicas reconstructivas y las técnicas de cirugía estética de la mama. Ese “gusto” por no conformarse sólo con “simular” una mama, si no, que ésta también luzca simétrica, hacen que ese objetivo ambicioso de reconstrucción hoy sea posible. La multiplicidad y el perfeccionamiento de las técnicas, en especial de las de tipo microrquirúrgico, permiten al cirujano establecer unas indicaciones específicas y adaptadas a las particularidades y expectativas de cada paciente. La microcirugía es un “arte” que requiere de experiencia y entrenamiento no al alcance de todos los cirujanos (Hernandez-Boussard T y cols, 2013).

4. Estado actual de la técnica de auto injerto de tejido adiposo.

El inicio de la utilización de TA como material de relleno en cirugía se remonta a principios del siglo XIX. A partir de ese momento se ha intentado ir perfeccionando las técnicas necesarias que permitan la redistribución de la grasa en forma de autoinjertos para poder eliminar las zonas sobrantes y rellenar las deficitarias.

En 1896 Czerny (Wilkins EG y cols., 2000) llevó a cabo una reconstrucción de mama de una mastectomía completa trasplantando un lipoma en su lugar. Más adelante, a principios del siglo XX se realizaron los primeros rellenos de TA en mama obteniendo buenos resultados al cabo de aproximadamente tres años (Lexer) (Harcourt DM y cols., 2003). Los avances en este campo fueron progresando, pero no fue hasta la octava década de ese siglo, con el desarrollo y popularización de las técnicas de liposucción, cuando se pudo obtener una fuente abundante de grasa purificada que permitiera su uso de forma sencilla. (Newman LA y cols, 1998; Taylor CW y cols, 2005).

Los primeros tratamientos mediante el uso de TA como material de relleno se desarrollaron en el área mamaria (Singletary SE y cols, 1996). publicándose los primeros trabajos sobre injerto de grasa en la Sociedad Californiana de

Cirugía Plástica y desencadenando así la polémica sobre la seguridad del procedimiento, que culminó en la declaración formal de la Sociedad Americana de Cirugía Plástica (ASAPS) que decía:

"El comité de forma unánime rechaza el uso de la inyección de grasa autóloga para el aumento mamario. Gran parte de la grasa inyectada no sobrevivirá, y la conocida respuesta fisiológica a la necrosis de este tejido es la cicatrización y calcificación. Como resultado, la detección del carcinoma de mama temprano a través de la xerografía y la mamografía se hará difícil y la presencia de la enfermedad puede quedar sin descubrir."

Esta opinión resultó no estar basada en ningún estudio científico ni en ningún dato objetivable, resultando en palabras de Sid Coleman, "un atraso injustificable debido a la ciencia mal practicada" y convirtiendo la inyección de grasa autóloga en mama en "*un tabú, equivalente a la mala praxis*".

Curiosamente, en las mismas fechas se comenzaron a presentar estudios de cirugía mamaria que reportaban una cantidad de cambios radiológicos y microcalcificaciones muy similares a esta práctica. En estudios sobre reducción mamaria se observaba que existía hasta un 50% de microcalcificaciones detectables hasta dos años después de la cirugía.

Problemas similares fueron detectados en otro tipo de cirugías de la mama, como el uso de los implantes de silicona para la reconstrucción, sin que tampoco esto despertara ninguna sensación de estar realizando algo incorrecto.

A causa del importante papel de un organismo tan relevante como la ASAPS, la comunidad internacional ha dudado mucho sobre el inicio de estudios en este campo, impidiendo una discusión sobre el procedimiento y creando una notable ausencia de información sobre el tema.

A pesar de este “veto” derivado de la declaración de la ASAPS, lo cierto es que en el resto del mundo se iniciaron una serie de estudios con el fin de averiguar qué verdad se escondía tras esa afirmación de condena del procedimiento.

En el 2006 cuando se publicó el primer artículo discutiendo las aseveraciones de la postura oficialista (Sid Coleman), existían ya más de 30 publicaciones al respecto. En 2012 se referenciaban más de 60 estudios (F. Claro, et al 2012) superando los 600 en el 2015 (Heat .J . Charvet et al 2015). Sin embargo, tras la revisión de la literatura mundial y la aplicación de los filtros de calidad exigibles a los trabajos verdaderamente científicos, únicamente 16 estudios pasaron el corte, estando incluidos en tres ellos el trabajo desarrollado en esta tesis doctoral (Moltó y cols, 2013).

Los avances en este campo no sólo han sido sobre la seguridad del tratamiento en si, sino también sobre el grado de utilidad en reconstrucción mamaria diferida o inmediata, el tratamiento de los daños de la RT en el tórax, en la comprensión de los cambios de la radiología mamaria y en la utilidad del uso de TA como tratamiento regenerador tisular (Conde-Green, Alexandra y cols., 2016).

El intento de trasplantar grasa autóloga, como hemos mencionado anteriormente, arrancó hace varios siglos y se ha intentado aplicar en todos los formatos. Desde el trasplante de un lipoma entero (Zcech, 1897) a autores que usaban tiras de tejido dermograso llegando a las modernas técnicas de lipoaspirado con las distintas variantes de tratamiento.

El injerto graso autólogo es cada vez más utilizado para el aumento y la reconstrucción mamaria y para gran cantidad de patologías y procedimientos tal y como veremos más adelante.

Los injertos de grasa son fácilmente disponibles, biocompatibles, causan baja morbilidad en los donantes y dan a los sitios injertados un aspecto natural. Sin embargo, el injerto de grasa generalmente se considera un procedimiento impredecible con una retención a largo plazo que varía generalmente entre 10% y 80% (Lei, Hua y cols., 2016).

A pesar del esfuerzo desarrollado para la optimización de este procedimiento, la práctica clínica ha avanzado de forma más rápida que la investigación básica en este campo, centrándose los escasos y recientes estudios de investigación en el desarrollo de protocolos para la recogida, procesamiento y manejo del TA para su posterior auto injerto enfocados al desarrollo de métodos quirúrgicos óptimos (Toledo LS y cols., 2006).

4.1. Biología del TA.

4.1.1. Mecanismos de supervivencia del injerto graso.

Aunque los procedimientos de injerto de TA han sido realizados con el objetivo principal de restaurar la pérdida de tejido blando, el mecanismo real sobre cómo el injerto de grasa sobrevive sigue sin estar aun completamente entendido.

Una antigua teoría sobre la supervivencia del injerto de grasa se basa todavía en la teoría de supervivencia celular propuesta por Peer a principios de los años cincuenta (Peer, 1950). Sobre la base de su estudio experimental preliminar, propuso que el mecanismo de la supervivencia del injerto de grasa se basa en la circulación establecida de forma precoz de la anastomosis del injerto de grasa y los vasos sanguíneos del huésped, sobreviviendo este injerto durante

los cinco días que conlleva este proceso de la difusión tisular de oxígeno del líquido plasmático intercelular.

Recientemente, varios estudios han demostrado nuevos conceptos de la supervivencia del injerto de grasa, uno más avanzado basado en la antigua teoría de la supervivencia celular de Peer y otro basado en el nuevo descubrimiento y comprensión de las células madre derivadas de TA. (Kamakura T, 2011).

4.1.1.1. Teoría de la supervivencia de los adipocitos del injerto de grasa.

La teoría de la supervivencia celular de Peer ha establecido nuestra comprensión fundamental de cómo un injerto de grasa puede sobrevivir después de trasplantarlo in vivo. Se trata de una teoría ampliamente conocida y popular, que ha sido referenciada en multitud de trabajos científicos a lo largo de varias décadas.

Es obvio que los adipocitos dentro de los injertos de grasa tienen que permanecer viables después de que los injertos de grasa se cosechan y procesan. En general, los injertos de grasa deben recolectarse con una técnica menos traumática y procesarse de manera que el aceite, el agua y los glóbulos rojos puedan ser eliminados para que los injertos de grasa permanezcan relativamente concentrados y unificados.

Sobre la base del estudio de Carpaneda y Ribeiro (Carpaneda et all 2009), injertos de grasa a tan sólo 2 mm del borde del tejido vascularizado podrían sobrevivir tras el injerto de grasa mediante imbibición plasmática debido a que estos injertos de grasa entrarían en contacto con el lecho de tejido receptor con potencial restablecimiento del suministro de sangre al injerto.

Por lo tanto, la técnica para inyección de injerto de grasa debe ser menos traumática también y sólo una pequeña cantidad de injertos de grasa se colocan durante cada inyección. Los injertos de grasa también se deben inyectar con múltiples pases dentro de múltiples túneles de tejido y diferentes planos. De esta manera, los injertos de grasa tendrían una cantidad máxima de contacto con el sitio receptor para asegurar el posible restablecimiento de la circulación a los injertos. (Strong AL et all 2015).

La teoría de la supervivencia del injerto puede establecerse luego basándose en este estudio experimental bien realizado. Sin embargo, esta teoría en sí misma no puede explicar todos los efectos del injerto de grasa observados clínicamente, y por lo tanto, es posible que pueda haber diferentes mecanismos sobre cómo el injerto de grasa sobrevive tras el trasplante in vivo.

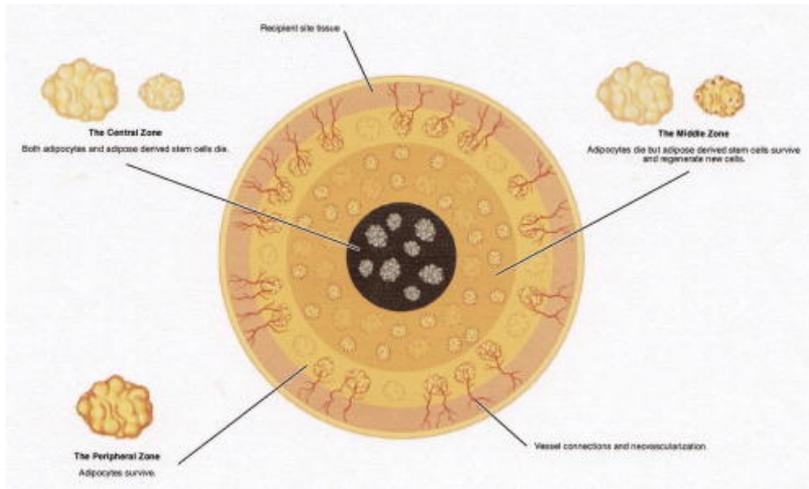


Figura 4. Representación esquemática de la combinación de las dos teorías, la de la supervivencia del injerto y la del remplazo celular. La zona periférica sobreviven los adipocitos trasplantados. En la zona intermedia mueren y son reemplazados por células mesenquimales y en la zona central de isquemia, ambas fallecen. (From Pu, 2014).

4.1.1.2. Teoría del remplazo celular.

El destino de los adipocitos después del injerto de grasa no vascularizado ha sido ampliamente estudiado por Yoshimura et al de la Universidad de Tokio. Los autores han desafiado la creencia común de que los adipocitos vivos trasplantados podrían sobrevivir y permanecer vivos durante un largo período.

Ellos crearon un modelo de isquemia inducida quirúrgicamente cortando los vasos sanguíneos que suministran las almohadillas de grasa inguinal en ratones. Bajo diferentes grados de hipoxia, los cambios isquémicos se analizaron mediante tinción de montaje completo,

inmunohistoquímica, citometría de flujo y transferencia de Western. Con este modelo animal, los autores pudieron examinar la supervivencia de los adipocitos en condiciones hipóxicas tanto in vitro como in vivo con 3 diferentes grados de isquemia (leve, intermedia y grave). Encontraron que bajo isquemia severa, todos los adipocitos sufrieron cambios degenerativos y posterior remodelación del tejido adaptativo.

Los adipocitos dentro de la almohadilla de grasa mueren fácilmente en condiciones isquémicas, mientras que las células progenitoras derivadas de adiposidad podrían sobrevivir bajo condiciones isquémicas y se activaron y contribuyeron posteriormente a la reparación del tejido adiposo. Los autores han propuesto la teoría del reemplazo de injerto después de injertos de grasa y la suplementación con células derivadas de adiposo o células progenitoras pueden aumentar y acelerar el proceso de reparación en el tejido adiposo bajo isquemia (Pu y cols., 2015). (Figura 4).

En un estudio posterior, los mismos autores mostraron evidencia de muerte temprana de adipocitos y reemplazo de adipocitos a través de la activación y regeneración de células progenitoras o derivadas de tejido adiposo. En este estudio de referencia, mostraron a través de un estudio animal in vivo que la mayoría de los adipocitos dentro del injerto comenzaron a morir el día 1 y sólo algunos de los adipocitos situados a 300 μm del borde del tejido sobrevivieron. El número de células proliferantes aumentó a partir del día 3. Se

detectó un aumento de adipocitos viables en el día 7, lo que sugiere que la reparación y regeneración de los adipocitos muertos había comenzado del día 3 al día 7. En la zona desde la periferia hasta el centro del injerto, los adipocitos sobreviven; en el área de regeneración los adipocitos mueren, pero las células madre sobreviven y en la zona necrótica, tanto los adipocitos como las células madre mueren. Este estudio mostró pruebas convincentes de la remodelación dinámica del tejido adiposo después del injerto de grasa. Sólo hay una pequeña porción de los adipocitos que sobreviven en condiciones parcialmente isquémicas. Sin embargo, la mayoría de los adipocitos en el área regenerativa sobreviven a través de la activación de ADSCs.

4.1.1.3. Hipótesis actual de la supervivencia celular con la unificación de ambas teorías.

La teoría del reemplazo del injerto o la teoría de la supervivencia del injerto representan la comprensión actual de lo que sabemos sobre cómo el injerto de grasa sobrevive después del trasplante in vivo, aunque la teoría del reemplazo del injerto puede necesitar ser confirmada aún más en un gran estudio animal o clínico. En el esquema, tomado de la misma fuente del autor que formula ambas teorías, resume ambas teorías sobre cómo el injerto de grasa sobrevive después del trasplante in vivo y debe ser entendido por cirujanos plásticos que realizan procedimientos de injerto de grasa para sus pacientes (Garza y cols., 2015).

Esta sería pues la secuencia de supervivencia celular postoperatoria después de un injerto de grasa. Sobre la base de sus estudios en animales, casi todos los adipocitos (excepto aquellos situados a 300 μm de la superficie del tejido) mueren dentro de los primeros días después del injerto de grasa. La adipogénesis se inicia con células madre y progenitoras derivadas de tejido adiposo activado y termina en 3 meses, mientras que las gotitas lipídicas restantes (adipocitos muertos) se absorben durante los próximos 9 meses. Algunos de los adipocitos muertos son reemplazados por nuevos adipocitos de la siguiente generación durante los primeros 3 meses, mientras que otros no. Las gotitas de lípidos son absorbidas por la fagocitosis de los macrófagos, pero la absorción es muy lenta y el período de absorción depende del diámetro de las gotitas lipídicas. Cuando el diámetro de las gotitas de lípidos es grande, la pared del quiste se forma antes de la absorción completa y la pared del quiste calcifica con el tiempo. En el área central del injerto, incluso las células progenitoras derivadas de tejido adiposo mueren y los nuevos adipocitos no se producen, dando como resultado tejido cicatricial o formación de quistes.

Se puede decir pues que el volumen final obtenido después de la realización de un injerto de grasa viene definida por la tasa de sustitución de los nuevos adipocitos.

Una vez acabado el proceso de prendimiento, lo que nos quedará será injerto de grasa embebido de pequeñas gotitas a

modo de quistes oleosos de retención, si estas son de pequeño tamaño, al final de los tres meses el injerto tiene ya su volumen definitivo. Si por el contrario son mas abundantes y de mayor tamaño, estas van a persistir hasta el año de duración, que será el momento en que el injerto alcance su tamaño definitivo.

Este proceso no es igual en todos los pacientes, encontraremos situaciones en las que el mecanismo de supervivencia dominante será la de la supervivencia del adipocito injertado, en otros será un componente mixto y en el resto podremos decir que la mayoría de la nueva celularidad que encontraremos será directamente neotrasformada desde las nuevas células mesenquimales que se han diferenciado en adipocitos mayoritariamente, pero también en células de estirpe vascular y mesenquimal.

4.1.1.4. Teoría del nicho celular de Coleman.

Existen otras teorías similares a la del reemplazo del injerto como la que acabamos de ver, pero la más aceptada la propugnó el grupo de Coleman, en su tratado sobre el injerto graso escrito en 2009 (Coleman, 2009).

En ella desarrolla un concepto parecido que el denomina “EL NICHOS” y hace referencia al concepto de nicho ecológico en el que las interacciones entre los distintos elementos inducen a que las especies se vayan diferenciando en unos u otros

elementos de forma que siempre exista un equilibrio poblacional que asegure un buen funcionamiento de la globalidad y por tanto la supervivencia del conjunto.

Así, en un ambiente propicio, la diferenciación de las stem cells sería hacia adipocito, mientras que en otras circunstancias predominarían las células de estirpe vascular.

Las interacciones celulares que conllevan a los distintos mecanismos de diferenciación son extremadamente complejas y se están comenzando a conocer ahora. A modo de ejemplo se estudian mecanismos de cómo las células mesenquimales derivadas del adipocito o ASCM pueden regular por vías complejas la cantidad de linfocitos inhibidores o supresores, manteniendo de esta forma la homeostasis de la colonia.

Un estudio reciente demostró que las sesiones de tratamiento con células madre derivadas de precursores adiposos múltiples tuvieron efectos inmunomoduladores que prolongaron la supervivencia de aloinjertos y aumentaron los porcentajes de poblaciones de células T reguladoras CD4 + CD25 + FoxP3 + Rodent hindlimb modelo. Sin embargo, el mecanismo por el cual las células madre derivadas de precursores adiposos exhiben su efecto inductor de tolerancia todavía no está claro (Chien, 2016).

4.2. Fisiología del Injerto de Tejido Adiposo y la importancia de su riqueza en células mesenquimales indiferenciadas.

4.2.1. Células comunes.

- **Adipocito:** Aporta la fracción “volumétrica” del conjunto ya que constituyen la mayor parte de este, mediante proteasas se puede disgregar el conjunto, liberando una serie de proteínas muy activas en los procesos regenerativo ligados a este tipo de injertos.

Tiene una actividad hormonal reconocida que es la secreción de Adiponectina.

La adiponectina es una de las proteínas plasmáticas más abundantes, constituyendo el 0,01% de las proteínas plasmáticas totales. Las concentraciones plasmáticas de adiponectina rondan los 5-10 µg/mL y presentan dimorfismo sexual, ya que las mujeres presentan niveles de esta hormona superiores a los hombres. Básicamente, regula el depósito de grasa en el organismo a través de complejos mecanismos, así se puede ver que la concentración de adiponectina es inversamente proporcional al IMC. (Schaffler A, Muller-Ladner U, Scholmerich J, Buchler C. Role of adipose tissue as an inflammatory organ in human diseases. *Endocr Rev* 2006; 27: 449–67).

- **Macrófagos:** reaccionan a los niveles de adiponectina circulante; estos activan los subtipos M1 y M2 necesarios en los procesos regenerativos.

Cuando se incuban en presencia de adipocitos producen un aumento importante de la diferenciación a preadipocitos.

- **Linfocitos T:** Inmunomodulación, control de la respuesta inflamatoria creando un medio ambiente adecuado. (Frauwirth KA, Thompson CB. Regulation of T lymphocyte metabolism. J Immunol 200).

- **Fibroblastos:** Son los creadores de lo que en literatura inglesa se denomina Scaffold y que correspondería a la ultraestructura de las colonias maduras. Algo así como el andamiaje intercelular que permite la sostenibilidad de un conjunto estructurado. Weidler C, Holzer C, Harbuz M, Hofbauer R, Angele P, Scholmerich J, et al. Low density of sympathetic nerve fibres and increased density of brain derived neurotrophic factor positive cells in RA synovium. (Ann Rheum Dis, 2005).

- **Células endoteliales:** Productoras de la angiogénesis necesaria para la supervivencia. Actúan a través de secreción de factores tipo VEGF, TGF y PDGF.

- **Células Precursoras (ADCS):** Son células que acaban diferenciándose en adipocitos.

Tienen actividad paracrina muy potente, secretando multitud de factores de crecimiento y citoquinas: VEGF; HGF, bFGF, (angiogénesis); Interleuquina II con efectos antiinflamatorios e inmunosupresores; TGF- β fibronectina, factor formador de colonias, ECM. Por definición, una célula madre se caracteriza por su capacidad de auto-renovación y su capacidad para diferenciar a lo largo de múltiples vías de linaje.

- **Pericitos:** Formadores de pequeños vasos sanguíneos. En algunas ocasiones pueden exhibir carácter multivalente o pluripotente y pueden transformarse en adipocitos.

- **Preadipocitos:** Acabarán diferenciándose en adipocitos como única ruta posible, a diferencia de otras células que aún conserven capacidad polivalente.

- **Célula progenitora endotelial:** Son promotoras de la angiogénesis pero a partir de la remodelación de pequeñas redes vasculares ya existentes.

Liberadores de señales que modulan el comportamiento y evolución de las células pluripotenciales mesenquimales. Crearán el marco de referencia para el desarrollo de una verdadera red capilar. Proporcionan la necesaria tensión para la movilidad y diferenciación de las distintas células (mecanotensión).

4.3. Implicaciones biológicas de las células mesenquimales indiferenciadas y su posible repercusión para su uso clínico.

4.3.1. Introducción.

Las células madre mesenquimales representan una población de células raras de progenitores multipotentes Anker y cols., 2004; Izadpanah y cols., 2006).

Su capacidad de auto-renovación, la diferenciación y la modulación inmune los convierte en candidatos ideales para las terapias basadas en células madre. Las terapias con células madre se han traducido en la práctica clínica de las lesiones y las enfermedades del aparato locomotor. Sin embargo, la seguridad de los mecanismos de expansión de células madre mesenquimales con fines clínicos plantea preocupaciones científicas y de seguridad.

La interpretación de la expresión alterada de las proteínas reguladoras representa un paso adelante hacia el logro de criterios de buenas prácticas de fabricación conforme a las estrategias basadas en células.

La presencia de factores de crecimiento y citoquinas es una muestra más de todas las que se han observado desde el inicio del estudio de las stem cells que demuestran la complejidad biológica de estas células, lejos de el papel

inerte inicial que les otorgaba al principio al tejido adiposo como simple reservorio energético.

Los estudios que se han realizado demostrarían:

1. Capacidad para interactuar físicamente por contacto directo con las células vecinas.

Se realizó un experimento para observar que capacidad de interacción podían presentar estas células. En él se incubaban células mesenquimales derivadas de tejido adiposo extraídas mediante centrifugación y digestión con tripsina para romper los puentes proteicos.

Al ponerlos en contacto con cultivos celulares se observaba la presencia de tres pruebas evidentes de interacción celular.

2. Filopodia: en menos de 48 horas se pueden ver puentes intercelulares entre ambas células que implican un intercambio protoplasmático directo, sin necesidad de intermediación de mediadores. (Figura 5).

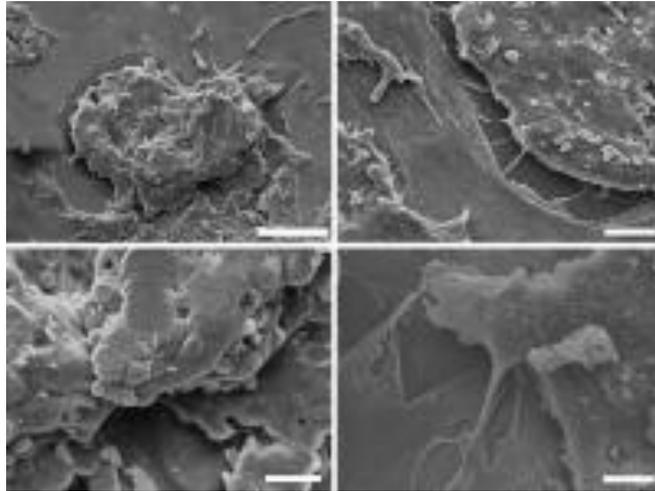


Figura 5. Mecanismo de filopodia que permite observar la formación precoz de puentes intercelulares que servirán para el intercambio vesicular. Rowan y cols 2014.

Por el contrario, las células del co-cultivo de ACDS y adipocitos humanos, a las pocas horas presentaban también un crecimiento tridimensional que conducía a la formación de unas pseudoesferas con morfología sugestiva del crecimiento tumoral. (Figura 7).

Independientemente del parecido con una estructura de apariencia tumoral, lo cierto es que las células cultivadas en compañía de células pluripotenciales, presentaban un crecimiento mucho más activo, y de alguna forma más anárquico que las células del monocultivo de adipocitos. Las células indiferenciadas de alguna manera promueven un crecimiento más acelerado, probablemente por la liberación de factores de crecimiento del que se ha visto su potencial.

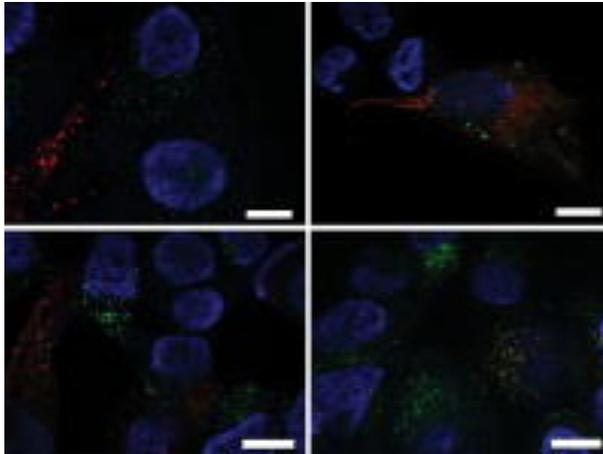


Figura 6. Esta figura nos muestra el fenómeno de intercambio vesicular, apreciable con el uso de comoforos de distintos colores. Se observa un activo intercambio entre las células derivadas del tejido adiposo y las células tumorales. Rowan y cols 2014.

3. Intercambio vesicular: Se introdujeron cromóforos biológicos marcados con anticuerpos fluorescentes que permitieron observar bajo luminiscencia fluorescente el intercambio de vesículas de forma muy activa entre las células indiferenciadas ADCS y las células del tejido adiposo humano co-cultivadas. (Figura 6).

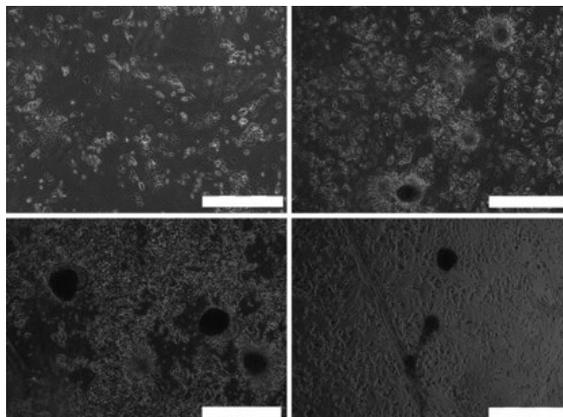


Figura 7. Formación de "Tumoresfere": tras el inicio del cultivo, se dividieron dos grupos celulares, los adipocitos de línea de cultivo a los que no se les agregó stem cells ADCS, y un segundo grupo en el que se co-cultivaron ambos tipos celulares: tejido adiposo y stem cells ADCS. El primer grupo las células de cultivo crecieron lentamente, formando unas capas bidimensionales, siguiendo un patrón de crecimiento radial y expansivo, bastante ordenado, en el que al final apenas se apreciaban irregularidades.

4.3.2. Secreción de citoquinas.

Las citoquinas son un conjunto de proteínas que regulan interacciones de las células del sistema inmune. Su función inmunorreguladora es clave en la respuesta inmune, en la inflamación y en la hematopoyesis de distintos tipos celulares.

Las citoquinas son un conjunto de proteínas de pequeño peso molecular sintetizadas por multitud de células especialmente las células del sistema inmune. Su función es inmunorreguladora siendo fundamentales en la comunicación y en las interacciones que establecen las células del sistema inmune entre sí y con otras células. Las citoquinas dirigen la respuesta inmune innata y la respuesta inmune específica e intervienen en la inflamación y en la hematopoyesis. Para ello activan a macrófagos, eosinófilos, células NK y neutrófilos, inducen la producción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno por parte de los macrófagos y participan en los procesos hematopoyéticos. Participan en procesos tan importantes como la inflamación, la regulación de la expresión del MHC (Major Histocompatibility Complex) de

clase I y de clase II, las respuestas inmunosupresoras, la regulación del cambio de isotipo de inmunoglobulinas, la quimiotaxis y la función efectora, normalmente citotoxicidad.

Desde un punto de vista funcional existen cinco familias principales de citoquinas:

- La familia de las citoquinas inflamatorias.
- La familia de las citoquinas hematopoyéticas.
- La familia de las citoquinas producidas por linfocitos Th1.
- La familia de las citoquinas producidas por linfocitos Th2.
- La familia de las quimioquinas, con efecto quimiotáctico.

También se pueden agrupar por familias según su estructura tridimensional:

- Familia de estructura de tipo hematopoyetina.
- Familia de los interferones.
- Superfamilia de las inmunoglobulinas.
- Familia de estructura tipo TNF (Tumour Necrosis Factor: factor de necrosis tumoral).

Las citoquinas se caracterizan por su pleiotropía y su redundancia funcional. Suelen actuar sobre las células uniéndose a receptores específicos. Pueden actuar localmente o en células más alejadas del sitio de producción. Algunas citoquinas importantes funcionalmente son las

interleuquinas, los interferones o los factores de necrosis tumoral.

Con los inicios de la medicina regenerativa, aquella que emplea el potencial de las células indiferenciadas en el crecimiento, reparación y sustitución de los distintos tejidos, hubo un máximo interés en averiguar que tipo de citoquinas y en cantidades se secretaban por estas células, todo en vistas, claro está, a dilucidar en qué medida estas células usadas como terapia tenían capacidad de desencadenar efectos adversos. Concretamente qué capacidad tenían para acelerar o promover procesos tumorales.

Un resumen de la posible actividad secretora de linfoquina, demostraba la presencia de estos factores:

- **IL-1.** En los tumores malignos de mama y en las líneas de cultivos celulares, la presencia de interleukina 1 está ligada a la pérdida de receptor estrogénico y al crecimiento tumoral.
- **IL-2.** La interleukina 2 es el factor de expansión clonal de las células T activadas por antígeno, por lo que cabría pensar que su aumento es debido a la presencia de células inflamatorias T47D.
- **IL-6.** Habría una quimiotaxis ligada a la interleukina 6 que dirigiría las células ASC al tumor primitivo y haría que se expresara un factor ligado al aumento de metástasis óseas.

- **IL-10.** Se sabe que la interleukina 10 está ligada al inicio y al posterior desarrollo de los tumores mamarios pero este mecanismo no está bien establecido.
- **Smm.** El factor de proliferación del SMM actúa induciendo la formación de células mieloides depresoras que evolucionan a células natural killers, con el consiguiente deterioro de la respuesta inmune al tumor.

4.3.3. Cambios en la expresión fenotípica antigénica superficial.

No ligado a las citoquinas, se han detectado dos cambios bioquímicos importantes. Uno va en referencia a la transformación fenotípica, en cuanto a la expresión de los antígenos de superficie que expresan ciertas células, y que van ligados a procesos patológicos. Y el otro, a la adhesión molecular.

- **Transición epitelial/mesenquimal:** (desarrollo de fenotipo mesenquimal) necesario para la diseminación, presentan un fenotipo al 50%. Estos asocian tendencia a la diseminación y peor pronóstico. Algunos de estos marcadores están aumentados hasta 50 veces.
- **Molécula de adhesión celular epitelial:** antígeno de expresión en células epiteliales. Ha comenzado a usarse como marcador clínico de la presencia de células tumorales circulantes. Se asocia a peor pronóstico ya que normalmente se observa

sobreexpresión en los tumores de mama avanzados así como en los carcinomas de células escamosas.

4.3.4. Sobreexpresión génica.

Durante la evolución del conocimiento del cáncer de mama, del conocimiento de la biología tumoral, se ha descubierto que las células neoplásicas, en su transformación desde una célula del epitelio ductal, cambia en la expresión de determinados genes. Esto es, fenotípicamente deja de transcribir proteínas convencionales y se dedica a fabricar fragmentos del ADN que normalmente, es decir que la célula sana o no neoplásica no sintetiza.

Lejos de tener un papel meramente descriptivo, estas expresiones de nueva aparición, se ha visto que tienen un carácter altamente predictivo en la naturaleza de la biología concreta de cada tumor, y a su vez esto tiene unas implicaciones en cuanto a la posible terapia a utilizar y en cuanto a la supervivencia y recidiva.

En este experimento, se decidió el uso de células madre o pluripotenciales derivadas del tejido adiposo ADCS y se valoró en qué medida expresaban una batería de genes, asociados todos ellos a cáncer de mama. (Figura 8).

Como ejemplo más evidente a nuestra práctica clínica mencionar el ERB-2.

Se sobre expresa en aproximadamente 25-30% de las pacientes con cáncer de mama. Esto está asociado a una incrementada actividad biológica del tumor, es decir, una tasa de división acelerada por mayor respuesta de la célula a los niveles normales de factores de crecimiento. Generalmente es indicativo de una evolución desfavorable del cáncer de mama. Las pacientes con cáncer de mama que presentan amplificación de HER2/neu presentan generalmente una forma más agresiva de cáncer, además de una mayor resistencia a tratamientos convencionales.

El ERB 2 se asocia a ninguna respuesta al tratamiento postoperatorio con TAMOXIFENO, sin embargo, son pacientes que responden mejor al tratamiento combinado de quimioterapia con trastuzumab, un anticuerpo monoclonal humanizado que se dirige contra el dominio extracelular del receptor Her2/neu, aumentando la tasa de supervivencia de las pacientes.

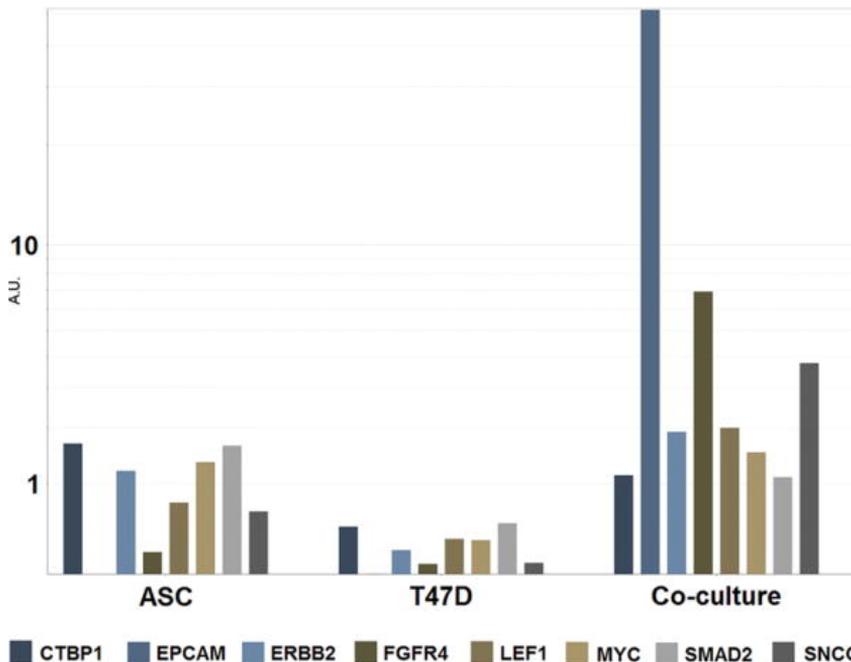


Figura 8. Que nos muestra la expresión génica que obtenemos en tres tipos tisulares: el primero ASC son células mesenquimales contenidas del tejido adiposo. El segundo grupo lo constituye el de células tumorales de cultivo de la línea celular T47D y el tercer grupo el cultivo de ambas conjuntamente. Rowan y cols, 2014.

Queda así evidente la utilidad clínica de los distintos genes que están tipificados.

Para las diferencias de expresión en estos genes se desarrolló un panel génico de los principales genes en tres distintos grupos celulares:

- a. Uno de células Stem cells derivadas de tejido adiposo.
- b. Otro con células cancerosas de una línea de cultivo.
- c. Y un tercer grupo con un co-cultivo de ambos grupos celulares.

Los resultados que se obtuvieron en este experimento mostraban un aumento muy significativo (aunque no estadísticamente significativo) de la expresión génica.

Los autores deducen pues que de mezclar células tumorales con un tejido en el que hubieran células cancerosas, la potencialidad regeneradora de las células ACS, se volverían en contra de la salud del huésped, ya que esta capacidad regeneradora se volcaría con las células cancerosas haciéndolas prosperar, y según este estudio de expresión génica, sacando lo peor de cada célula.

5. Técnica quirúrgica del injerto de tejido adiposo.

Coleman fue el pionero en la difusión de principios básicos como la necesidad de extraer injertos de pequeño calibre para que pudieran sobrevivir al ser depósitos en pequeños “gránulos”.

Para esto insistió en la idea de la técnica “multitúnel” desarrollando un proceso de depósito de los injertos en un enrejado tridimensional o “scaffold” de los ingleses, que define muy bien el concepto que se quiere recrear.

Coleman, también, es el primero en insistir en dos conceptos

- 1) **La necesidad de recogida a traumática de los injertos:** Coleman al igual que otros autores piensa que los mecanismos que existen hasta el momento para recoger injertos, que en realidad eran las mismas cánulas que se gastaban para extraer la grasa en las liposucciones convencionales, son demasiado cortantes, lo que provoca que durante la lipoaspiración se destruyan demasiadas células por daño en sus membranas.

Se trata de una cánula que tiene un borde similar a las asas de diatermia, pero completamente roma. Su mecanismo se basa en disgregar los lobulillos de grasa en lobulillos de menor tamaño. (Figura 9).



Figura 9. Cánula tipo Coleman (Coleman 2006).

- 2) **La utilidad de la centrifugación:** después de la liposucción, lo que se obtiene es una mezcla de grasa, sangre, líquido de infiltración, y fragmentos de tejido conjuntivo que forman los septos interlobulillares e interlobulares del tejido graso, así como fragmentos de la fascia de Scarpa. Este material está claro que contiene demasiadas impurezas que no tenemos

ningún interés en volver a reinyectar al paciente ya que no aportaran ningún beneficio. (Figura 10).



Figura 10. Centrifuga adaptada a la purificación del lipoaspirado obtenido de una liposucción de tejido adiposo.

Para ello había que idear un mecanismo que permitiera depurar todos estos restos y hubo dos corrientes, las que optaron por la decantación que es un mecanismo ya explicado, y el que eligieron los autores norteamericanos que fue la centrifugación.

Por efectos mecánicos, las células más pesadas y el agua irán a depositarse al fondo.

Inmediatamente por arriba encontraremos la parte sólida, en la cual en la parte más profunda habrá una mayor cantidad de fibras colágenas desgarradas mezcladas sin solución de continuidad con las células del tejido adiposo formando microesferas,

dependiendo estas del calibre de la cánula que haya sido empleada para la extracción.

Y por último, en la parte superior del frasco del centrifugado, encontraremos una capa de aceite que corresponde al vertido del interior citoplasmático de los adipocitos que han sido dañados durante el proceso de extracción.

De todas estas fracciones la única que posee interés para realizar un injerto graso corresponde a la fracción de tejido adiposo.

Con el proceso de decantación las fracciones que se obtiene son muy similares, pero la capa de tejido adiposo tiene más líquido que con el mecanismo de centrifugación. (Figura 11).

A favor pues de la centrifugación, es que la fracción de grasa es mas “pura” por denominarlo de alguna manera. Por el contrario, presenta una mayor tasa de lisis celular en el proceso de realización, y además presentan un gran inconveniente, que no es práctica cuando se trata de procesar grandes volúmenes. Para unos glúteos por ejemplo que la cantidad a procesar puede superar los 1000 cc no es viable.

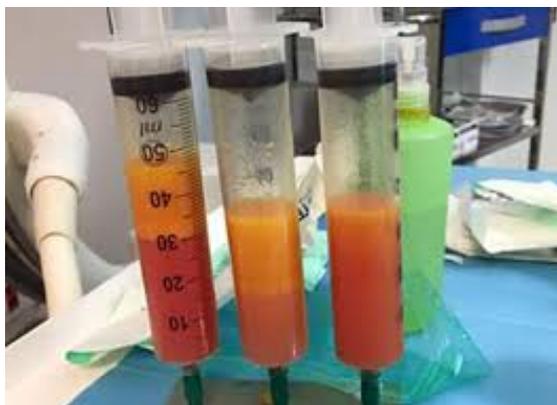


Figura 11. Decantación convencional en jeringa de lipoaspirado. Obsérvense las fases obtenidas de líquido de infiltración y grasa.

Las características de cómo tenían que ser los parámetros para la realización de la centrifugación de la grasa para obtener unos parámetros lo más viables posibles han sido unos de los campos en los que más trabajos se han realizado.

En un estudio histológico, (Kurita) encontraron una mayor concentración de adipocitos y una menor cantidad de líquido de infiltración y desechos celulares. Sin embargo, esto tiene un efecto limitado sobre la viabilidad celular inherente. Otros autores (Coleman y cols., 2009) mostraron que las fuerzas de centrifugación de más de 3000 g durante 3 minutos, no alteraron significativamente la relación lípido/adiposa/fluido, en comparación con las fuerzas inferiores. Además, no hay diferencia en la proporción de adipocitos rotos entre muestras no centrifugadas,

frente a muestras que se centrifugaron con fuerzas diferentes, como se evaluó por microscopía electrónica de barrido. Por el contrario, *Boschert* y *Puckett* considera que el aumento de volumen de la capa de lípidos fue debido a la ruptura de los adipocitos y recomendó ninguna fuerza mayor que 100 g ser utilizado en la centrifugación. Esto puede ser debido a las gotitas de lípidos de la superficie separados por centrifugación.

Demostraron un aumento viabilidad de los adipocitos, la supervivencia, y la expresión de "progenitoras" (detectable mediante expresión de genes marcadores) siguientes a la inyección en el organismo receptor del centrifugado de alta densidad.

Por el contrario, Conde-Green et al encontró que la centrifugación se tradujo en adipocitos más alterados como se ve por la histología, en comparación con las muestras decantadas.

El uso de un protocolo de centrifugación 3000 rpm, estos autores también aislaron una cuarta capa en la base de muestras centrifugadas, que era rico en $CD45^{-} / CD34^{+} / CD105^{+}$ y $CD45^{-} / CD31^{+}$ o sea células progenitoras. La centrifugación resultó en una concentración disminuida de preadipocitos y el tejido conectivo y se correlacionó con los resultados más

pobres en base a la evaluación clínica de la retención de volumen de injerto, aunque la morfología de adipocitos se mantuvo sin cambios.

Sin embargo, en estos estudios no se especificó el radio de la centrífuga usado, y como la fuerza centrífuga depende del radio de la centrífuga; es posible que fuerzas mucho más elevadas fueran utilizadas en alguno de estos estudios, lo que pudo alterar la proporción de adipocitos y las células de la fracción vascular estromal.

La importancia capital de el método escogido para tratar el injerto es de suma importancia en este apartado porque de la supervivencia del injerto dependerán en gran parte las complicaciones que pueden enmascarar la aparición de una lesión neoplásica, que serían las calcificaciones, los quistes oleosos y las distorsiones cicatriciales de la arquitectura normal de la mama.

6. Hallazgos y complicaciones en la técnica de injertos grasos.

La grasa autóloga es un excelente relleno de tejidos blandos, dada su abundancia y facilidad de obtención.

Más específicamente la inyección de grasa autóloga intramamaria sólo debe utilizarse con precaución.

Desde el inicio de esta técnica, los detractores encontraron los siguientes de problemas en el uso específico en la reconstrucción mamaria.

- 1) **Diseminación de células tumorales** preexistentes que hubieran quedado tras una extirpación cancerosa. Esto es bastante obvio en la técnica multitúnel. El procedimiento de la liposucción y la reintroducción implica un instrumento diseminado por arrastre células de todo tipo y obviamente las cancerosas.
- 2) **Quistes oleosos** y lesiones de relleno compatibles con depósitos oleosos que se pueden confundir con lesiones malignas.

La supervivencia de grasa autóloga después del injerto depende de la revascularización de los pequeños gránulos de grasa, que se produce cuando los capilares de la zona de acogida se introducen en los gránulos de grasa injertada revascularizándolos. Algunos de los datos han demostrado que la revascularización se produce dentro en los 3 días en los gránulos de grasa más pequeños. Sin embargo, si el volumen de los gránulos de grasa injertada es demasiado grande o demasiado concentrada, como cuando el exceso de grasa se inyecta en la misma región en una sola sesión, no se pueden formar amplios contactos con los tejidos

del huésped. Aunque el tejido periférico puede sobrevivir, la región central sufre gradualmente necrosis de licuefacción, debido a la incapacidad para formar conexiones vasculares con el sitio de acogida. Por otra parte, si el lecho graso del injerto está muy dañado, como por ejemplo cuando se complica por un hematoma o infección, la supervivencia de la grasa inyectada está también comprometida. Si la necrosis grasa no puede ser completamente reabsorbida, se produce la fibrosis o calcificación. Cuando el centro de la lesión necrótica se convierte licuado y el tejido circundante se convierte en cavidades quísticas, la presentación es quística. Las áreas que con mayor frecuencia se presentan este tipo de lesiones son el espacio retromamario inmediato y el tejido celular subcutáneo.

En estudios parecidos al de Coleman cuantificando a que cantidad de grasa se inician las complicaciones, se llegó a la conclusión de que 150 ml de grasa por lado son la frontera que asegura la aparición de estas complicaciones.

- 3) **Calcificaciones.** Se ha visto la aparición de lesiones por depósito de calcio en una gran cantidad de pacientes que han sido sometidas a un auto injerto graso. Tras varios años de episodios de alarma, muchas publicaciones acabaron demostrando que el depósito de calcio que se puede producir lo constituyen

macrocalcificaciones, que a los ojos de un radiólogo son fácilmente diferenciables de las microcalcificaciones que se producen en la aparición de la mayoría de las neoplasias malignas.

4) **Distorsión en el patrón arquitectural de la mama.**

Las cicatrices que provoca la técnica multitúnel pueden acabar provocando distorsiones del patrón normal estructural de la mama, clasificadas en la escala Bi Rads, como una muestra de lesión potencialmente maligna BIRADS 3, que podría confundir al radiólogo. Es más, la presencia de estas lesiones podría provocar que la aparición de nuevas lesiones produjera un enmascaramiento de las antiguas y que se atribuyese al injerto graso la aparición de las mismas retrasando el diagnóstico de neoplasia maligna.

5) **Infecciones.** En el árbol glandular de la mama viven bacterias. La infección a partir de un procedimiento quirúrgico de estas características puede provenir de dos fuentes: de la normal incidencia de las infecciones en los procedimientos quirúrgicos sean cuales sean. Así dependerá del cirujano y del huésped, de las medidas de asepsia y antisepsia, de la profilaxis antibiótica y del cuidado de los tejidos, así como del estado inmunitario de la paciente, la presentación de una infección quirúrgica al uso. Pero además, la presencia de una flora bacteriana normal dentro del árbol glandular, hace que la rotura de estos conductos en la realización del

trazado multitúnel con cánula que se emplea para estos procedimientos.

- 6) **Hemorragia.** La aparición de hemorragia/hematoma consecuencia de un sangrado quirúrgico es una parte consustancial de cualquier procedimiento quirúrgico. Tiene como consecuencia la posibilidad de persistencia de hematomas que pueden llegar a organizarse y a calcificarse, cursando como masas sólidas que pueden llegar a despertar una gran inquietud a la paciente al inducirle a pensar que lo que tiene es una lesión neoproliferativa, suelen presentar a la palpación características que las hacen difíciles de diferenciar de una neoplasia.
- 7) **Abscesos.** Esta es la parte más negativa que combina la formación de áreas necróticas que no sobreviven del injerto, con la sobreinfección bacteriana propia de cualquier cirugía o como veíamos previamente de la propia red glandular de la mama. Los abscesos mamarios post injerto graso tienen una especial significación ya que producen secuelas estéticas al drenar, sea espontánea o quirúrgicamente, produciendo retracciones cicatriciales y pérdida de volumen severo asociado a distorsión importante de la arquitectura de la mama.

7. Necesidad de conocimiento exhaustivo de la radiología de la mama injertada.

7.1. Introducción.

La transferencia de grasa a los pechos sanos, es decir, en las mujeres sin antecedentes de enfermedad de mama, en particular el cáncer de mama, se está convirtiendo cada vez más popular. La cuestión principal es si la transferencia de las células de grasa en la mama nativa, dificulta la visualización de mama. Esta preocupación es especial en las reconstrucciones mamarias con grasa, en la que la aparición de necrosis grasas seguidas del injerto, puede llegar a crear preocupación entre el paciente y el cuerpo médico, por la dificultad de distinguirlo de una recidiva cancerosa. Durante los principios de la técnica hubo una especial preocupación en este aspecto de control radiológico de las recidivas. Ya Coleman, en su estudio de 2005, encuentra que de sus 17 pacientes dos desarrollaron en años posteriores un cáncer de mama, y enfatiza la cuestión de que ninguna de ellas sufrió ningún retraso en el diagnóstico.

Más tarde aparecieron estudios prospectivos con nivel de evidencia III, en los que radiólogos a doble ciego evaluaban pacientes que habían seguido un injerto graso, siguiendo la escala de hallazgos de la escuela de radiología norteamericana

En ella encontraban que el hallazgo más frecuente eran quistes oleosos, seguidos de imágenes hipoeoicas, y masas quísticas con ecos internos. Solamente en el cuatro por ciento no encontraban hallazgos que demostrasen que había habido un procedimiento ajeno a la normal fisiología de la mama. (Figura 12).

Classification	Description	No. of Cases (%)
A	Solid mass, hypoechoic	15 (22.7)
B	Solid mass, isoechoic	1 (1.5)
C	Solid mass, hyperechoic	2 (3.0)
D	Solid mass, complex	7 (10.6)
E	Typical cystic appearance/ anechoic mass with posterior acoustic enhancement	27 (40.9)
F	Cystic mass with internal echoes	10 (15.2)
G	Negative ultrasound findings	4 (6.1)

Figura 12. Hallazgos en porcentaje de las distintas lesiones que se hallan en radiología mamaria tras injerto graso en la mama por motivos estéticos. Costantini M, Cipriani A, Belli P, et al. Radiological findings in mammary autologous fat injections: a multi-technique evaluation. Clin Radiol. 2013.

Hay un gran interés en establece unos criterios para diferenciar adecuadamente las lesiones propias del injerto graso con las lesiones malignas, de ahí el esfuerzo de estos autores en crear un sistema de clasificación de imágenes para establecer diagnósticos y algoritmos de tratamiento en función de los hallazgos. (Parik y cols, 2012).

También evaluaron la evolución de las lesiones encontradas, así vieron, tras el seguimiento con ultrasonido en una

mediana de 6,5 meses en 17 pacientes, evolución en 29 masas. Veinte masas se mantuvieron estables, cinco disminuido de tamaño, dos transición a una apariencia más quística, y uno tanto disminuido de tamaño y la transición a una apariencia más quística. Una masa desapareció y 12 masas fueron rebajadas en grado de malignidad ecográfico. No hubo crecimiento de ninguna masa, ni cambios en la vascularización, y ya no fue necesario realizar ninguna biopsia mas.

7.2. Seguimiento de los pacientes con injertos grasos.

Se han planteado, además, cuestiones de logística en relación con la vigilancia de los pacientes inyectados con grasa. Cuál sería el seguimiento óptimo que deberían seguir estos pacientes y cuando los pacientes son seguidos por sus médicos locales, si están equipados con los conocimientos y la experiencia para diferenciar lesiones benignas de las malignas y, si no, la determinación de la mejor manera de educar e integrar nuestros colegas médicos en cirugía oncológica de mama, radiología y medicina general para gestionar de forma segura las complicaciones.

En la actualidad, no existen pautas National Comprehensive Cancer Network que definan un protocolo de detección de recidivas o metástasis después de la mastectomía con reconstrucción mamaria. En la mayoría de los centros, la vigilancia es mediante un examen físico (Wang, y cols, 2011).

8. Técnica quirúrgica en caso de reconstrucción mamaria inmediata.

En la reconstrucción mamaria inmediata, que es el objeto del estudio de la presente tesis, existen complicaciones añadidas inherentes a la propia idiosincrasia de la técnica que vamos a emplear que hace que esta sea, según recogen los libros, imposible, ya que al rellenar un tumor extirpado se produce un absceso por el radio mínimo que tienen estas lesiones.

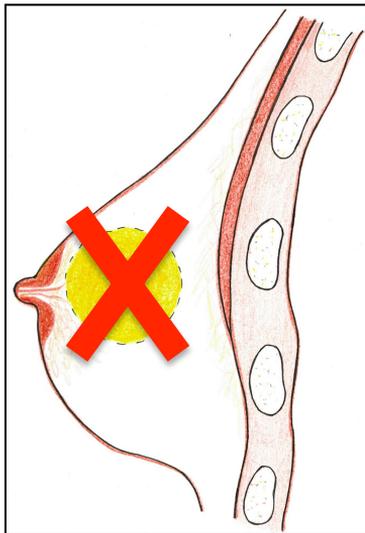


Figura 13. Esquematiza la imposibilidad teórica de realizar una reconstrucción mamaria de forma inmediata tras una tumorectomía, la cavidad dejada por la tumorectomía devendrá en un absceso. (Nelligan 2012, Volumen 2).

:: JUSTIFICACIÓN

II. JUSTIFICACIÓN.

En el periodo dilatado de tiempo dedicado de forma profesional y vocacional a la reconstrucción mamaria, más de 20 años, asistí con júbilo a la llegada de los distintos avances en la cirugía reconstructiva que nos permitieron ir superando los distintos problemas que teníamos y que íbamos teniendo según evolucionaban las técnicas de los cirujanos oncológicos.

Costó mucho pero conseguimos implantar la reconstrucción mamaria inmediata como algo muy beneficioso.

Las técnicas microquirúrgicas pasaron a ser rutinarias, a pesar de la última complejidad de este tipo de cirugías y la gran experiencia y formación que requiere su uso de forma fiable.

Y así fuimos avanzando hasta que el avance de la cirugía oncológica que impulsó de forma notable la cirugía conservadora, nos planteó un problema que no podíamos resolver.

Empezamos a encontrar secuelas de tumorectomía y cuadrantectomía que no eran aptas para reconstrucción con colgajos autólogos libres o pediculados, y que tampoco por tamaño se ajustaban a las indicaciones de estos dispositivos protésicos.

Además, estos últimos o los colgajos tenían un inconveniente añadido, la radioterapia que por sistema se aplica a los pacientes que se acogen a la cirugía conservadora: por una parte los colgajos sufrían un proceso de fibrosis y retracción junto con hiperpigmentación cutánea que deslucía bastante el resultado final. Con las reconstrucciones con prótesis teníamos peores resultados, las contracturas capsulares eran tan constantes e intensas que en un altísimo número de casos la reconstrucción fracasaba.

Algo había que intentar.

Hoy en día, los injertos de TA constituyen una de las herramientas fundamentales dentro del campo de la cirugía reconstructiva, siendo de uso cotidiano y cada vez más extendido. Esto es debido a su sencillez y escasa morbilidad, y sus infinitas aplicaciones dentro de la cirugía plástica. De este modo, el TA se ha afianzado como un material de relleno ideal para el uso clínico, aunque aún quedan ciertos detalles técnicos que se han de perfeccionar: simplificar las técnicas de extracción, optimizar la cantidad extraída, mejorar las técnicas de procesamiento, minimizar las pérdidas y maximizar las tasas de prendimiento.

Todas estas ventajas contrastan con la poca evidencia que poseemos de la inocuidad de su uso. A priori se podría pensar que nada más inocuo para el organismo que sus propios tejidos, pero por razones, a lo mejor no siempre

obedeciendo a verdaderas razones de salud, en la bibliografía mundial aparecieron voces de alarma sobre el uso de estos injertos.

Dado que entre las voces que lo cuestionaban había voces tan autorizadas con la propia ASPS era muy importante asegurarse de lo que íbamos a hacer.

Quedaba, además, una cuestión muy importante, más incluso que los detalles vistos en el párrafo anterior: hacer bueno el legado de Hipócrates: “*primum non nocere*”, entendiéndolo en este caso como tener la seguridad razonable de que con nuestra intervención no causaremos a la paciente ninguna alteración o agravamiento de su enfermedad cancerosa.

Por lo tanto, revisamos toda la bibliografía disponible comprobando que había una gran disparidad en las valoraciones de los distintos autores sobre si el uso de injertos grasos podía activar o desencadenar un proceso canceroso.

La primera cosa que llamó la atención es que en las múltiples localizaciones y usos de los injertos grasos, sólo la mama ha despertado preocupación oncológica y en ningún otro tejido se han detectado reacciones adversas, ni notificaciones de efecto adverso alguno de carácter oncológico las células pluripotenciales que tanto riesgo parecen poseer sólo afectan al sistema celular mamario dejando indemne o indiferente al

del resto del organismo en donde se aplica este tipo de terapias.

Tampoco encontramos mucha coherencia en los estudios celulares ya que no encontramos ni uno solo que estudiase células de tejido adiposo tal cual se usa en la clínica, ya que todo lo que encontrábamos, bajo el nombre de injerto de tejido adiposo, en realidad se trataba de mezclas purificadas o enriquecidas con células mesenquimales indiferenciadas con una concentración de estas de alrededor de 100 veces las que encontramos en los injertos convencionales.

Por lo tanto desconocíamos, in vitro, cual podía ser el efecto real de esta terapia que implica poner en contacto células adiposas y mesenquimales con células del parénquima mamario.

Sin embargo, tampoco parecían haber evidencias sólidas en contra de su uso. A medida que se iba consolidando la técnica cada vez veíamos mas ventajas y menos problemas.

Nuestra experiencia quirúrgica nos permitió diseñar una técnica que, por si había algún problema en la citada interacción celular, nos permitía poner el injerto alejado del foco tumoral y en ningún caso en contacto con la glándula, obteniendo un resultado estético que consideramos muy notable.

El hecho de que los estudios que empezaban a aparecer de series de alguna importancia, aunque referidos a reconstrucciones diferidas, no presentaban ningún resultado adverso, nos animó plantear a los distintos comités evaluadores de proyectos de investigación clínica.

Nuestros argumentos eran: las ventajas incuestionables de la técnica: fácil, económica, poco peligrosa, no alarga el tiempo quirúrgico y sin efectos secundarios a largo plazo, entendiendo por estos a los que incluían la dificultad de **diagnóstico** de una posible recidiva o promoción de la misma.

Así pues, decidimos que tras las evaluaciones favorables de los comités era una técnica que se podía estudiar.

Al final el proyecto que pretendemos demostrar es: que con nuestra técnica personal de reconstrucción mamaria mediante injertos grasos autólogos, obtenemos un resultado estético satisfactorio sin complicaciones agudas importantes, y sin que a largo plazo observemos un aumento de las recidivas o de la gravedad de las mismas, bien porque con el injerto pudiéramos promover o acelerar nuevos cánceres, o porque con el injerto y la técnica de aplicación pudiéramos crear una dificultad diagnóstica de las posibles recidivas.

Todo esto valorado mediante técnicas objetivas como la radiología específica o mediante análisis estadístico de las recidivas y su comparación con los resultados

convencionales, que nos permitan asegurar sin ningún tipo de duda que se trata de una técnica fiable.

:: HIPÓTESIS

III. HIPÓTESIS.

Planteamos como hipótesis, que el tejido adiposo extraído como injerto de la propia paciente es una técnica fiable y segura en cuanto a que obtendrá los tres requisitos básicos de cualquier reconstrucción, a saber:

- 1) Conseguir un resultado estético y funcional óptimo que devuelva a la paciente su condición previa a la cirugía evitando el estigma de la mutilación.
- 2) Conseguirá este fin sin técnicas que impliquen complicaciones, secuelas en zonas donantes o alteraciones en zonas donantes o receptoras que supongan dificultades diagnósticas o terapéuticas en el futuro.
- 3) Desechar las técnicas que puedan ocasionar una promoción de la aparición de nuevos tumores o aumentar las posibilidades de crecimiento o difusión a posibles restos tumorales que hubieran quedado tras la cirugía.

:: OBJETIVOS

IV. OBJETIVOS.

1. Objetivo principal.

El objetivo del presente estudio ha sido desarrollar una técnica de reconstrucción mamaria inmediata mediante injertos grasos autólogos, con un diseño quirúrgico propio e innovador, que evite situaciones de riesgo al interponer grasa en el espacio glandular, demostrando que se trata de una técnica segura, que obtiene excelentes resultados estéticos y funcionales.

2. Objetivos secundarios.

Evaluar los cambios radiológicos que esta técnica ejecutada de esta manera produce en la glándula. Valorar los parámetros de normalidad para el uso futuro de la técnica. Descartar que produzca ningún efecto adverso que implique pérdida de calidad en el diagnóstico radiológico futuro.

Valorar la interacción celular de los injertos grasos con las células tumorales en un modelo experimental con el fin de averiguar si aumenta la facilidad de las células tumorales de mama para producir o acelerar el proceso de metastatización.

:: METODOLOGÍA

V. MATERIALES Y MÉTODOS DEL ESTUDIO EXPERIMENTAL PARA EVALUACIÓN DE LA ALTERACIÓN DE LA CAPACIDAD DE METASTATIZACIÓN TRAS INJERTO DE GRASA, EN MODELO MURINO DE CÁNCER DE MAMA.

El presente trabajo se ha diseñado como estudio experimental, prospectivo y descriptivo con dos líneas de trabajo distintas:

1. En la primera línea de trabajo se desarrolló un modelo de cáncer de mama en animales de experimentación para observar “in vivo” el efecto del TA en el desarrollo metastásico.
2. En la segunda línea de trabajo se desarrolló la técnica quirúrgica de infiltración a distancia del foco tumoral con el fin de disminuir el contacto celular entre ambas estirpes disminuyendo el riesgo de promoción tumoral.

El presente estudio ha sido llevado a cabo en los laboratorios del Hospital Universitari y Politècnic La Fe de Valencia, así como en los laboratorios del departamento de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Valencia y Centro de Investigación Príncipe Felipe durante los años 2010-2016. El reclutamiento y selección de pacientes se

realizó en los quirófanos y consultas pertenecientes a la Unidad de Mama del Hospital La Fe de Valencia.

El estudio contó con la aprobación del Comité Ético de Investigación Biomédica del Hospital Universitario y Politécnico La Fe de Valencia, así como la autorización del Servicio de Sanidad y Bienestar Animal de la Dirección General de Producción Agraria y Ganadería para llevar a cabo la experimentación animal. El presente trabajo fue estructurado en 2 apartados diferenciados con algunos aspectos comunes en cuanto a metodología.

1. Efecto del TA en el desarrollo de metástasis en CM.

Con el fin de simular una situación quirúrgica lo más realista posible, desarrollamos un modelo de CM metastásico humano para evaluar in vivo si el TAH de lipoaspirados abdominales promueve el crecimiento tumoral y la invasión. Para ello una línea celular de CM metastásica, MDA-MB-468 fue mezclada con TAH y se inyectó ratones inmunodeprimidos. La progresión metastásica fue seguida por un sistema de imágenes in vivo.

1.1. Selección de pacientes.

Los estudios realizados en pacientes humanos y la recogida de muestras se llevó a cabo en conformidad con las normas sobre experimentación humana dimanantes del código de

Núremberg, declaraciones de Helsinki (1964), Tokio (1975), Venecia (1983), Hong-Kong (1989), Sídney y complementarias, directiva 91/507/CE, R.D. 561/1993, convenio de Bioética del Consejo de Europa (BOE 20-10-99), y código de Ética y deontología médicas vigente.

Se incluyeron en este estudio seis hembras blancas adultas (edades: 23-57 años) que no tenían enfermedades metabólicas sistémicas importantes, trastornos lipídicos o tumor activo. Se descartaron pacientes con antecedentes de tratamiento citostático, corticoide o inmunosupresor. Se obtuvo el consentimiento informado antes de la recolección de tejido adiposo. Aunque los nombres se mantuvieron confidenciales, la edad del paciente y la historia de la medicación estuvieron en todo momento disponibles para consulta. Se recolectaron un total de 20 ml de injertos de grasa del abdomen inferior de cada paciente mediante una técnica a traumática utilizando una cánula de liposucción contundente conectada a una jeringa de 10 ml, siguiendo los principios de la técnica de Coleman. Esta lipoaspiración se centrifugó con 1000 rpm durante 3 minutos. Después de retirar el suero y la fracción oleosa, se obtuvo una muestra de grasa limpia y se utilizó para estudio in vivo en animales.

En el estudio fueron incluidas, previo consentimiento informado, a una población de pacientes cuyos criterios de elegibilidad y exclusión se detallan a continuación:

Criterios de elegibilidad de los pacientes.

a. Criterios de inclusión:

- Mujeres ≥ 18 años y < 60 años
- Intervenidas por patologías locales (no sistémicas).

b. Criterios de exclusión

- Historia previa de tratamiento con citostáticos, corticoides o inmunodepresores.

Previo a la inclusión de la paciente en el protocolo se llevó a cabo en la consulta cirugía plástica del Hospital Universitario y Politécnico La Fe el registro de variables tales como: filiación, edad, antecedentes médico-quirúrgicos, antecedentes familiares, peso y altura, índice de masa corporal (IMC), Fumadora, antecedentes obstétricos/ginecológicos, tratamientos recibidos y zona donante de TA; así como exploraciones previas a la cirugía (Exploración general, Preoperatorio completo: analítica con hemograma, hemostasia, bioquímica, ECG, RX tórax e interconsulta al Servicio de Anestesia del Hospital Universitario y Politécnico La Fe).

1.2. Recogida y procesamiento de muestras.

El procedimiento de extracción, procesamiento y manejo de los injertos de TA se realizó siguiendo las directrices del protocolo de Coleman, que se detallan a continuación:

- 1) **Extracción:** la grasa se extrajo de zonas donantes seleccionadas por ser fácilmente accesibles y donde existiera TA disponible, siendo abdomen o muslos las localizaciones más frecuentes. En general, este procedimiento se puede realizar bajo anestesia local, regional, epidural o general, dependiendo de la cantidad de grasa que queramos extraer, las preferencias del paciente, el riesgo anestésico, o las características generales de la intervención.

Para la recogida de muestras de este estudio se realizó una incisión de 3 mm con bisturí de hoja 11 para la infiltración de la solución de Klein modificada (1 cc de solución por cada cc de grasa a ser extraído): en la práctica habitual del Servicio del Cirugía Plástica del Hospital Universitari i Politècnic la Fe, el protocolo a seguir consiste en una mezcla de 500 ml de Ringer Lactada Viaflo Hartmann® (Baxter, Deerfield, Illinois, Estados Unidos), con 1 ampolla de 1 ml de adrenalina (1 mg/ml) (B.Braun, Melsungen, Alemania) a una dilución de 1:500.000. En caso de realizar el procedimiento con anestesia local, se añade a la

solución lidocaína (B.Braun) de 10 ml al 5%. Si el procedimiento quirúrgico se realiza bajo anestesia general el uso de lidocaína es evitado debido a su potencial toxicidad para el TA. Esta solución infiltrada tiene una triple función: por un lado, el volumen líquido ayuda a disgregar y separar las células adiposas, por otro la adrenalina disminuye el sangrado durante el procedimiento, y por último la lidocaína, en caso de ser utilizada, actúa como anestésico.

El TA fue extraído de forma a traumática evitando la lesión celular, para ello se utilizaron cánulas de 3 mm de diámetro, con 2 orificios distales y de punta roma, conectada a una jeringa de 10 ml con sistema "luer-lock". La cánula fue introducida en la zona donante a través de una pequeña incisión (3 mm aproximadamente) realizando movimientos hacia delante y detrás. Para moderar las presiones de aspiración, se creó presión negativa en la jeringa tirando del émbolo hacia el exterior, de modo que la combinación de la presión negativa y el efecto de curetaje de la cánula, permitieron la recogida del TA.

Para el procesamiento de las muestras de TA tras su extracción se siguió el procedimiento descrito por Coleman (Coleman 2006) con las siguientes modificaciones. Se llevó a cabo un circuito cerrado, para evitar una posible contaminación del TA, de forma

que al desconectar la cánula de la jeringa, el contenido de ésta se transfirió a tubos colectores mediante conexión tipo “luer-lock”, utilizando el kit Lipopras® (Proteal, Barcelona, España). El TA se transfirió a tubos colectores de 20 ml, con tapa, reduciendo al máximo la exposición del tejido al aire ambiente. La forma de estos tubos está diseñada para encajar en los manguitos esterilizables de la centrifuga Duografter II® (Proteal), manteniéndose así las condiciones de esterilidad durante todo el proceso. (Figura 14)

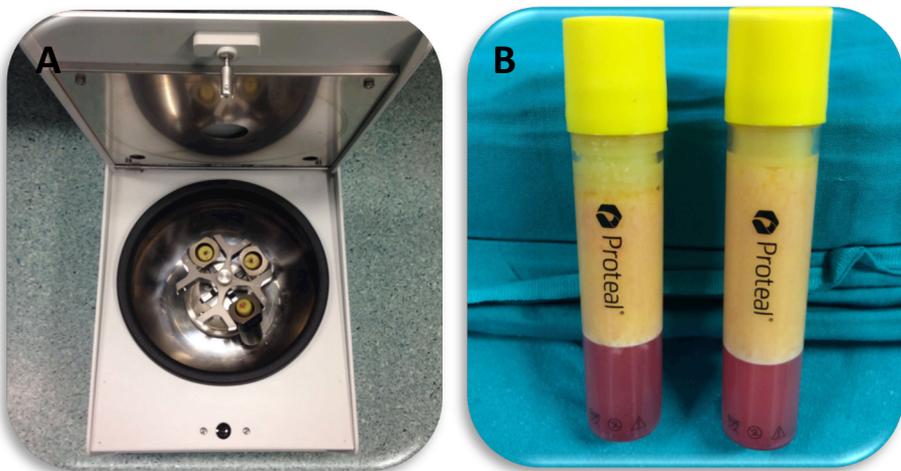


Figura 14. Procesamiento de muestras, protocolo Coleman. Centrifuga con 3 muestras de TA extraído (A). Tubos colectores de muestras de TA de 20 ml (B). Obsérvese las diferentes fases que se obtienen tras la centrifugación.

2) **Refinamiento:**

Fase situada en la parte inferior: líquido intersticial, restos serohemáticos y elementos acuosos (entre los que se puede incluir la lidocaína).

- Fase intermedia: TA principalmente, aunque también hay presencia de factores de crecimiento. Hay dos tipos de células: las células adiposas maduras; por otro lado, ADSCs, que en determinadas situaciones podrían diferenciarse hacia TA maduro, así como también tejido vascular, linfático, y actuar como soporte vital de los nuevos tejidos formados (Figura 5).
- Fase superior: aceites, lípidos libres que se liberan tras la rotura de algunas membranas plasmáticas adipocitarias. Se les atribuye efectos deletéreos sobre las células adiposas y sobre el prendimiento del injerto, debido a su citotoxicidad. Esta fase se debe decantar o descartar, así como también se puede utilizar papel absorbente estéril o algún algodón, para retirar los restos oleosos que queden.

En nuestro caso, se conecta de nuevo cada colector a jeringas con conexión “luer-lock”, y se aspira en primer lugar la fase superior (aceites) que se descarta. Las jeringas son de 5 ml o 1-2 ml (en función de la zona que

vayamos a injertar, en la mayoría de zonas del cuerpo se realizará con jeringas de 5 ml, sin embargo en la cara utilizamos de 1-2 ml para obtener mayor precisión), y volvemos a aspirar el contenido del colector, esta vez sólo la fase intermedia (TA), dejando en el depósito la fase inferior (acuosa).

Se ha de minimizar el tiempo que el TA está en contacto con el aire para evitar la lesión celular. Nuestra metodología utilizando los colectores, jeringas y conectores para transferencia del sistema Lipopras® (Proteal), mantienen la esterilidad durante todo el circuito cerrado, y minimizan el contacto con el aire ambiente.

1.3. Preparación de la línea celular MDA-MB-468.

1.3.1. Cultivo.

MDA-MB-468 es una línea celular de CM con un potencial metastásico elevado. Se aisló por primera vez en 1977 a partir de una muestra de derrame pleural de una paciente con CM que falleció de esta enfermedad (Cailleau et al., 1978). Presentan un crecimiento extraordinariamente rápido en cultivos poco enriquecidos, en parte por una regulación autocrina a partir de factores de crecimiento celular que ellas mismas secretan al medio.

Una alícuota de estas células congeladas fueron proporcionadas por Sergio Bañuls, encargado del servicio de

cultivo celular de la Unidad Central de Investigación de la facultad de Medicina de la Universidad de Valencia, que fueron descongeladas y cultivadas en medio de cultivo DMENF-12 con 10% de SBF inactivado y 1% de P-S (GIBCO, Paisley, Strathclyde, Reino Unido) previamente filtrado. A continuación se procedió a su siembra en un frasco de cultivo de 25 cm² (Orange Scientific, Bélgica) e incubación a 37°C y 5% de CO₂.

A las 48 horas se observó mediante microscopía óptica que parte de las células habían formado una monocapa y empezaban a adquirir la morfología característica de estas células. La monocapa formada fue lavada con PBS y disociada empleando el método de dispersión enzimática utilizando tripsina-EDTA 1X (GIBCO, Paisley, Strathclyde, Reino Unido) y se llevó a cabo su resiembra en medio de cultivo nuevo. Este procedimiento se repitió hasta alcanzar un total de 4 pases tras los cuales se procedió su infección viral e inyección a los animales.

1.3.2. Marcaje celular.

Las células en cultivo de MDA-MB-468 fueron marcadas mediante el uso de lentivirus para poder visualizarlas in vivo por fluorescencia.

Los lentivirus pertenecen a la familia *Retroviridae*, caracterizada por poseer un genoma de ARN y porque su ruta replicativa pasa por una fase en la que su información

genética aparece en forma de ADN de doble cadena. La partícula viral lleva dos copias de ARN genómico, presenta una estructura Cap en el extremo 5' y una cola poli(A) de unos 20 restos de longitud en su extremo 3'. Además presenta genes necesarios para su replicación y para mantener su capacidad infectiva, *gag*, *pol* y *env*. En el interior del virión también se encuentran varias copias de dos proteínas virales esenciales: la transcriptasa inversa e integrasa.

La infección y transmisión de estos virus a una célula hospedadora no necesita ningún vector, solamente del contacto directo entre los individuos. Tras la entrada del ARN genómico en la célula, la enzima transcriptasa inversa o retrotranscriptasa sintetiza una molécula de ADN de doble cadena que, con la ayuda de la integrasa, se inserta en el genoma de la célula infectada. Este ADN integrado se mantiene estable, siendo replicado como parte integrante de la célula hospedadora y transcrito por la maquinaria celular para producir todas las proteínas integradas en él (figura 4). Cualquier ADN incorporado en un retrovirus es expresado en la célula indefinidamente.

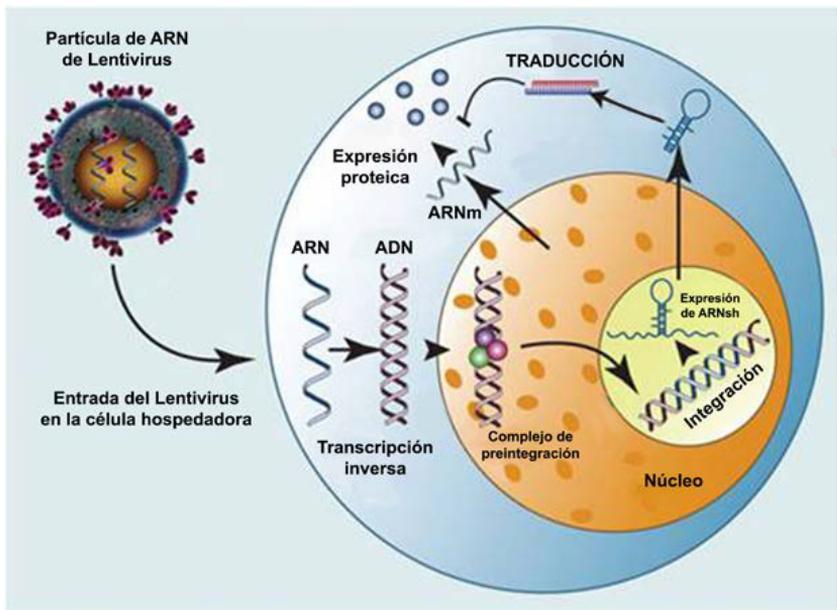


Figura 15. Infección lentiviral a una célula hospedadora. Se representa la infección retroviral a una célula en la cual se retrotranscribe el ARN a ADN del virus y se integra en el ADN celular, en donde es transcrito y traducido por la maquinaria celular, expresando las proteínas contenidas en el ADN viral. Imagen modificada de www.genengnews.com.

En nuestro caso, se utilizaron lentivirus que además de expresar los transcritos esenciales para su infección y transmisión, expresan la proteína “Cherry” y un gen de resistencia al antibiótico puromicina. “Cherry” se trata de una proteína fluorescente roja, que hace que las células que son infectadas por estos virus presenten dicha fluorescencia. La resistencia a puromicina hace que las células infectadas sean insensibles a este antibiótico, por lo que añadiendo puromicina al medio de cultivo se pueden seleccionar las células infectadas de las que no lo fueron. (Figura 15)

El marcaje de las células de CO y MO en cultivo se realizó añadiendo a cada pocillo 500 µl de medio de infección vírica:

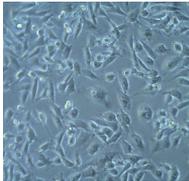
DMENF-12 (GIBCO, Paisley, Strathclyde, Reino Unido) con 10% de SBF (GIBCO, Paisley, Strathclyde, Reino Unido), $\frac{1}{4}$ del sobrenadante viral (proporcionados por Carmen María García-Pascual) y 8 μ g/ml de Polybrene (Merck Millipore, Darmstadt, Alemania) durante 24 h a 37°C y 5% de CO₂. Transcurridas 24 h, se retiró el medio de la infección y se añadió medio de cultivo DMENF-12 con 10% de SBF, 1% de P-S y 1% de fungizona (F) (GIBCO, Paisley, Strathclyde, Reino Unido). Cinco horas después se añadió el medio de cultivo con 1 μ g/1ml de puromicina (Sigma, St Louis, Estados Unidos), permitiendo la selección de las células infectadas, ya que solamente las células que incorporaron el virus presentan resistencia a puromicina. Además de por su supervivencia, las células infectadas se observaron de color rojo bajo el microscopio de fluorescencia (Nikon, Eclipse TS100) 48-72 h después de la infección. El medio de cultivo fue cambiado cada dos días hasta el momento de la recogida celular para su inyección en los ratones. (Figura 16).

Cuatro días después de la infección viral, la monocapa celular formada fue lavada con PBS y dissociada empleando el método de dispersión enzimática utilizando 400 μ l de tripsina- ácido etilendiamino tetracético (EDTA) 1X (GIBCO, Paisley, Strathclyde, Reino Unido) incubándolas 5 min a 37°C. Posteriormente, se añadió 800 μ l de medio de cultivo en cada pocillo y se recuperó toda la suspensión celular, que fue centrifugada a 1.500 r.p.m. durante 5 min. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 1 ml de DMEMF-

12 estéril (GIBCO, Paisley, Strathclyde, Reino Unido). La concentración celular obtenida se cuantificó en una cámara de Neubauer. Posteriormente se centrifugó nuevamente a 1.500 r.p.m. durante 5 min y una vez eliminado el sobrenadante, se resuspendió el pellet en 50 μ l de medio DMEMF-12 estéril (GIBCO, Paisley, Strathclyde, Reino Unido) para ser inyectado en la cápsula renal de los ratones correspondientes.



Cultivo celular en DMEMF-12+10%SBF+
1%P-S
a 37°C y 5% de CO₂



Infección viral 
DMEMF-12+10%SBF+1/4 sobrenadante
viral+8 μ g/ml de Polybrene 
24h a 37°C y 5% de CO₂



Selección células infectadas
DMEMF-12+10%SBF+1% de S-P+1% F+
1 μ g/1ml puromicina
37°C y 5% de CO₂

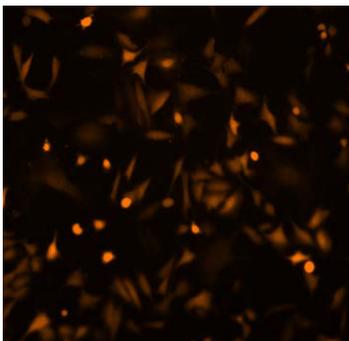


Figura 16. Esquema de cultivo celular e infección de la línea celular metastásica de CM MDA-MB-468. Se representa los pasos a seguir en el cultivo celular y el marcaje mediante lentivirus para su selección.

1.4. Modelo animal de CM.

Todos los protocolos de experimentación animal que se utilizaron en este trabajo de investigación se atienen a lo dispuesto en la normativa legal vigente y en particular en el Real Decreto 1201/2005 de 21 de Octubre sobre protección de animales, utilizada para experimentación y otros fines científicos y de acuerdo con la directiva 86/609/CEE, de 14 de Noviembre de 1986 en relación a la toma de muestras de animales.

Las células MDA-MB-468 cultivadas y marcadas fueron inyectadas en la cápsula renal de ratones inmunodeprimidos.

Se utilizaron ratones hembra de 5 semanas (Hsd: Athymic Nude-nu, Charles River laboratories, Wilmington, MA, ESUU) libres de enfermedades patológicas específicas (figura 17). Se estabularon en jaulas con filtro, en el interior de cabinas de protección, con una TA fijada de $21 \pm 1^\circ$ C, con ciclo de luz/oscuridad de 12/12h y humedad relativa del $55 \pm 10\%$ y en un área de bioseguridad libre de patógenos (SPF). Los ratones fueron mantenidos con alimentación ad libitum con pienso irradiado y agua autoclavada. La manipulación de animales se realizó siempre en el interior de campana de flujo laminar.

1.4.1. Cirugía.

Los animales fueron divididos en 3 grupos experimentales:

- **Grupo A:** ratones a los que se les inyectó una solución de células MDA-MB-468 en medio DMEMF-12 (500000 células/50 μ l).

- **Grupo B:** ratones a los que se les inyectó una solución de células MDA-MB-468 en medio DMEMF-12 y TAH (n=6, 500000 MB-468 células/25 μ l mezclado con 25 μ l de TAH).



Figura 17. Ratón transgénico utilizado. Ratón atímico Nude de 5 semanas de edad.

- **Grupo C:** ratones a los que se les inyectó medio DMEMF-12 (n=6, Control negativo, 50 μ l).

Las muestras de TAH procedentes de cada una de las donantes estuvieron presentes en todos los grupos experimentales siendo cada una utilizadas en 2 animales de cada grupo. El cálculo de las células metastásicas de la línea celular de CM MDA-MB-468 inyectadas por animal para asegurarnos un desarrollo metastásico en un plazo de tiempo relativamente corto se hizo en base a los estudios previos llevados a cabo en este modelo (Rodríguez-Iglesias et al., 2015).

Los animales fueron sometidos a solamente un proceso invasivo para la inyección del TAH y línea celular en su cápsula renal. Para ello, todos los animales fueron sedados mediante la administración de cloruro mórfico al 2% (B.Braun, Melsungen, Alemania) y anestesiados durante la operación por inhalación con isoflurano al 4% (B.Braun, Melsungen, Alemania). Además, se utilizó el analgésico postquirúrgico Buprex (RB Pharmaceuticals, Richmond, EEUU). Estos procesos invasivos se llevaron a cabo con material estéril, bajo una campana de flujo laminar y sobre una manta eléctrica para evitar la hipotermia. Todo el material fue previamente esterilizado por autoclave. Se aplicó una solución antiséptica (Povidona Iodada 10%) sobre la piel del animal y se procedió a la incisión de la piel en el lado dorsal izquierdo para acceder a la cápsula renal. Se realizó una inyección de 50 μ l de medio DMEMF-12 con la suspensión celular específica (MDA-MB-468 y TAH) y la incisión fue cerrada mediante una sutura "Monosyn 6/0" (B.Braun, Melsungen, Alemania). Una solución antiséptica (povidona Iodada 10%) fue aplicada sobre la piel del animal antes y después de la intervención.

1.4.2. Monitorización de las células inyectadas en los ratones.

La monitorización de la evolución de las células inyectadas se realizó mediante un sistema de imagen in vivo (Xenogen-IVIS 100 cooled CCD Optical Macroscopic Imaging System, SC

BioScience Corporation, Tokyo, Japan) (figura 18) realizando mediciones cada semana.

Este sistema utiliza una tecnología de imagen óptica para facilitar el seguimiento longitudinal del tráfico celular en animales vivos. Presenta un conjunto de filtros de alta eficiencia y una mezcla de espectros con algoritmos que permite sacar el máximo provecho de la luminiscencia y fluorescencia entre la región de longitud de onda desde el azul al infrarrojo cercano. El instrumento está equipado con 10 filtros de excitación de banda de 30 nm y 18 filtros de emisión de banda de 20 nm, que ayudan a reducir significativamente la autofluorescencia. (Figura 19)

El primer día de monitorización, después de la cirugía, se fijaron las longitudes de onda de emisión/excitación de mCherry, cuyo pico de absorción/emisión es de 587 nm y 610 nm, respectivamente.

Se establecieron 3 longitudes de onda de excitación y emisión (570-620 nm, 605-660 nm, 640-680 nm) (Figura 19) que fueron las utilizadas en cada medición. Dichas



Figura 18. Sistema de imagen in vivo.

monitorizaciones se realizaron bajo los efectos de la anestesia por vía inhalatoria mediante isoflurano al 3% (B.Braun, Melsungen, Alemania).

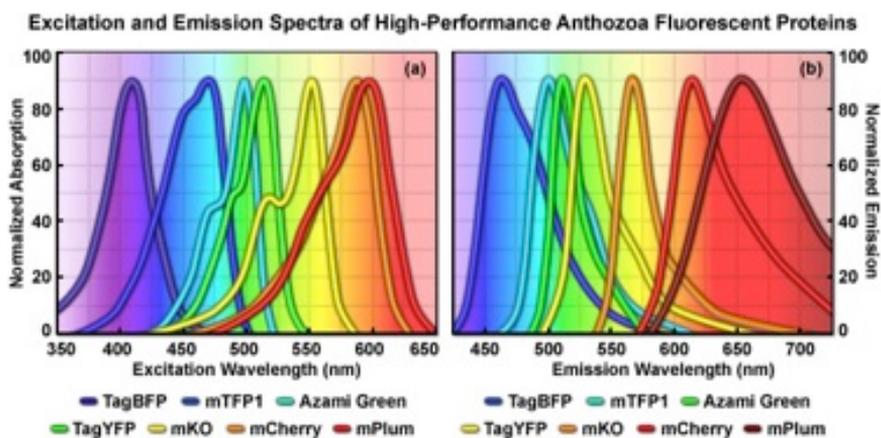


Figura 19. Rango del espectro de excitación y emisión para las diferentes proteínas fluorescentes. Observamos el rango perteneciente a mCherry que fue seleccionado para este estudio.

1.4.3. Análisis de la invasión metastática post-mortem.

Al cabo de 6 meses los ratones supervivientes fueron sacrificados mediante inhalación de CO₂. De cada uno de los ratones, tanto de los animales sacrificados como de los fallecidos por desarrollo tumoral, se realizó un análisis macroscópico morfológico con el fin de evaluar un posible daño tisular originado por la inyección de células cancerígenas. Además de cada uno de los ratones se extrajo la cápsula suprarrenal izquierda (en la cual se inyectaron las células), la cápsula suprarrenal derecha, el hígado, el bazo y el páncreas, ya que son los órganos en los que más frecuentemente se produce una metástasis a partir de células de CM. De cada uno de estos órganos se extrajo un fragmento para su inclusión en parafina y su posterior

análisis inmunohistoquímico, y el resto del órgano se guardó para su análisis molecular.

1.5. Estudios inmunohistológicos.

El método de IHQ consiste en una inmunotinción con el método avidina-biotina. Esta técnica se basa en la determinación de la expresión de una proteína de superficie celular utilizando un anticuerpo específico contra esa proteína. A continuación se utiliza un anticuerpo secundario contra el anticuerpo específico, que bien podrá estar biotinilado o bien estar unido a un fluorocromo que permita su posterior detección. En el caso de utilizar un anticuerpo unido a biotina se añade posteriormente el complejo avidina-peroxidasa, que al reaccionar con su sustrato dará color, más o menos intenso en función de la expresión de la proteína.

Cada una de las muestras fue procesada y analizada siguiendo el protocolo que se describe a continuación:

1.5.1. Fijación.

Este proceso se refiere al tratamiento del tejido con sustancias químicas, de manera que se mantienen las células estructuralmente intactas. Esto se logra al inactivar ciertas enzimas celulares que de otra manera iniciarían la autólisis y llevarían a la degeneración post-mortem. La fijación mantiene las estructuras al estimular la formación de enlaces cruzados entre las proteínas. Las muestras fueron

fijadas en formaldehído al 4% (GIBCO, Paisley, Strathclyde, Reino Unido).

1.5.2. Lavado.

Es necesaria la eliminación del exceso del fijador para evitar una posterior interferencia química en el proceso de inclusión. Los medios de inclusión utilizados son hidrófobos y precisan de la eliminación del agua del tejido, por ello, se realizó una deshidratación del tejido con etanol. Debido a que una gran parte del tejido está constituido por agua, se aplicó una serie gradual de soluciones acuosas de menor a mayor grado del agente deshidratante. Este paso se realizó de forma gradual ya que si se somete directamente el tejido a soluciones de etanol absoluto, éste se deformaría debido a que el agua tisular saldría muy rápidamente de la muestra.

Por lo tanto, se procedió a la deshidratación de las muestras en alcohol de gradación decreciente (50, 70, 80, 90%) y finalmente se sumergieron en 3 pases de alcohol absoluto (Panreac, Barcelona, España).

1.5.3. Aclaramiento.

Una vez deshidratado el tejido, se pasa a una solución de una sustancia que es miscible tanto con el alcohol como con el medio de inclusión a utilizar. La sustancia comúnmente utilizada es el xileno o xilol. Este proceso se llama aclaramiento ya que el tejido se torna transparente o claro en

el xileno, esto se debe a que cambia su índice de refracción.

Una vez deshidratadas las muestras, se aclararon mediante pasos sucesivos en xilol (Panreac, Barcelona, España) para extraer el agente deshidratante.

1.5.4. Inclusión.

Por lo general, los tejidos son estructuras blandas y frágiles, incluso después de la fijación. Previo a la obtención de los cortes, es necesario incluirlos en un medio de soporte. En estado líquido, estos medios tienen la capacidad de penetrar y rodear el tejido, de esta forma se puede producir el endurecimiento (por enfriamiento o por polimerización), para formar un bloque sólido que pueda ser cortado fácilmente en el microtomo.

Las muestras fueron depositadas individualmente en recipientes con parafina fundida a 60°C y se dejaron en las estufa durante 1 h a 60°C para que el xilol se evaporase y los espacios anteriormente ocupados por éste fuesen ocupados por la parafina. Este paso se repitió una vez más para eliminar la mayor cantidad de xilol posible de cada muestra. Después se colocaron las piezas en parafina fundida en un molde de metal rectangular, orientadas de forma adecuada y se dejaron solidificar a TA.

1.5.5. Corte.

El bloque de parafina con el tejido se puede cortar en secciones lo suficientemente delgadas como para permitir el paso de la luz. La mayor parte de los preparados para microscopía óptica tienen un grosor de 4 μm .

Una vez obtenidos los bloques de parafina con cada una de las muestras, se realizaron cortes de 4 μm de espesor. Para la obtención de estos cortes se utilizó el microtomo (Microm GMBH, tipo HM310, Walldorf, Alemania) con cuchillas de acero. Estos cortes se depositaron en un baño termostatzado a 37°C para eliminar las arrugas y pliegues debidos al corte. A continuación fueron recogidos con portaobjetos SuperFrost® Plus, Menzel-Gläser (Thermo Scientific, Massachusetts, Estados Unidos) para mejorar la adherencia de los mismos. Finalmente los cortes fueron guardados en una estufa a 37°C durante 48-72 horas para mejorar su secado y adhesión final.

1.5.6. IHC.

Los cortes fueron desparafinados mediante incubación a 60°C durante 1h y cuatro baños de xileno de 5 min cada uno. A continuación los cortes fueron rehidratados mediante inversión en etanol a concentraciones decrecientes. Tras un lavado con agua para eliminar los restos de etanol, se llevó a cabo el desenmascaramiento antigénico con un autoclave, sometiendo los cortes durante 3 min a 120°C, 1,5 Atm en

Tampón Citrato pH6 para romper los puentes disulfuro que se formaron al calentar a 60°C las muestras fijadas en formol y facilitar el paso del anticuerpo. Posteriormente, las secciones se incubaron con peróxido de hidrógeno (DAKO Corp., Barcelona, España) al 3% durante 10 minutos a TA para eliminar la actividad peroxidasa endógena. Seguidamente las muestras se incubaron, durante 1 hora y a TA en cámara húmeda, con el anticuerpo SBEM (Abcam, Cambridge, Reino Unido), diluido en tampón de bloqueo hasta obtener la concentración de trabajo necesaria. Como control negativo se utilizó PBS substituyendo así al anticuerpo primario. Como control positivo se utilizaron cortes de tumor primario de mama. Tras una incubación con el anticuerpo primario, las muestras se incubaron con el kit ENVISION (DAKO Corp., Barcelona, España) durante 30 minutos. Finalmente, se empleó una disolución con un sustrato cromógeno de peroxidasa durante 5 min. Entre cada incubación los tejidos fueron lavados tres veces con PBS. La contra-tinción se realizó con hematoxilina de Mayer y las secciones se montaron con cubreobjetos con una base de pegamento (Eukitt, Kindler GmbH, Freiburg, Alemania) como soporte para el mismo, de este modo las muestras pudieron ser guardadas a TA hasta su posterior fotografiado.

1.5.7. Observación y fotografía.

Las muestras fueron analizadas bajo microscopio óptico (LEICA DM4000B; Leica, Solms, Alemania) con sistema

digital de captación de imágenes (LEICA DFC450C; Leica, Solms, Alemania). La observación se llevó a cabo en cortes seriados, a distintos niveles para cada una de las muestras, con la intención de obtener unos resultados más objetivos de la globalidad del tejido. Para visualizar estas imágenes se utilizaron los objetivos de 5x, 10x, 20x y 40x.

El análisis morfológico se llevó a cabo considerando si las muestras presentaban ausencia o presencia de infiltración neoplásica. La observación de un marcaje específico de cada anticuerpo se consideró como positivo para la expresión proteica analizada, mientras que la ausencia de marcaje resultó en un resultado negativo para la expresión de dicha proteína.

1.6. Estudios moleculares.

1.6.1. Extracción de ARNm.

El ARN total se aisló utilizando el reactivo Trizol (Invitrogen, California, Estados Unidos) siguiendo las instrucciones del fabricante. Tras añadir 500 µl de Trizol y disgregar el tejido con la ayuda de un bisturí estéril, se añadió 100 µl de cloroformo (Sigma). Después de una centrifugación a 13.000 rpm durante 15 min y a 4°C se transfirió la fase acuosa a otro tubo y se le añadió 250 µl de isopropanol (Sigma). Tras una incubación durante 10 min a temperatura ambiente, se centrifugó a 13.000 rpm durante 10 min a 4°C. El precipitado fue lavado con 500 µl de etanol al 75% en agua DEPC

(Dietilpirocarbonato) filtrado y centrifugado a 7.500 rpm durante 5 min. Finalmente tras secarse los “pellets” de ARN se resuspendieron en 12 μ l de agua estéril libre de nucleasas.

1.6.2. Análisis de la concentración del ARN.

El análisis de la cantidad e integridad del ARN extraído de cada una de las muestras se llevó a cabo mediante métodos espectrofotométricos (NanodropTM, Thermo Scientific). Este equipo mide la absorbancia de todas las moléculas de la muestra que absorben a la longitud de onda de interés, desde nucleótidos, ARN, ADN monocatenario, y ADN de doble cadena. Todas ellas absorben a 260 nm y contribuirán a la absorbancia total de la muestra.

Se utilizó un ratio de absorbancia de 260/280 nm para medir la pureza del ARN y del ADN. La muestra se considera pura si presenta un ratio alrededor de 1,8 si se trata de ADN y de 2,0 si se trata de ARN. Si el ratio es menor indica la posible presencia de proteínas u otros contaminantes que absorben cercanos a la longitud de onda de 280 nm (Figura 20).

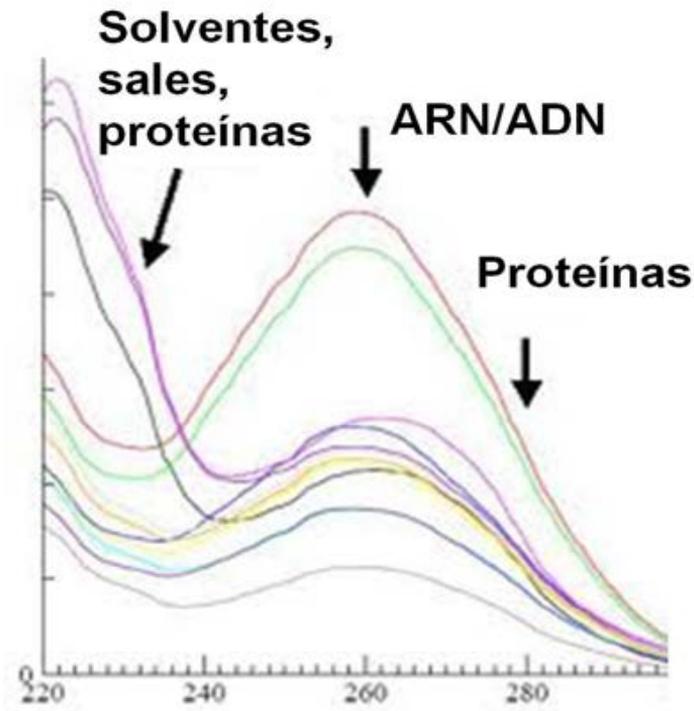


Figura 20. Gráfica de absorbancias de muestras de ARN o ADN. Se muestra las absorbancias en las que absorben el ARN/ADN y los posibles contaminantes de las muestras, como proteínas, solventes y sales.

1.6.3. Retrotranscripción.

La retrotranscripción del ARN se llevó a cabo mediante el kit AdvantageRT-for-PCR kit (Clontech, Palo Alto, California, Estados Unidos). Para cada muestra se añadió entre 0,2-1 µg de ARN a un tubo estéril de 0,2 ml y un 1µl de oligo (dT) a 20 µM (oligonucleótidos de unión aleatoria a la cadena de ARNm y que sirven como molde para la enzima retrotranscriptasa). Se incubó durante 5 minutos a 72°C y posteriormente se añadió una mezcla de: 4µl 5x reacción tamponada, 1µl desoxiNTP (desoxinucleótidos) (10mM), 0,5µl de inhibidor recombinante de la ribonucleasa (40 U/µl)y

1µl(200 U/µl) de la transcriptasa inversa del virus de la leucemia murina de Molowny (MMLV). Tras mezclar todos los componentes, las muestras se incubaron durante 1 hora a 40°C, seguido de una segunda incubación a 72°C durante 10 minutos para detener la síntesis de ADNc y paralizar la actividad de la desoxirribonucleasa. Finalmente la cantidad de ADNc se cuantificó mediante métodos espectrofotométricos. La muestra fue diluida con agua libre de ARN a una concentración final de 100 ng/µl y fue almacenada a -20° C hasta la realización de la RT-qPCR.

1.6.4. PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR).

La metodología de RT-qPCR, a diferencia de la PCR competitiva, permite la automatización y además es rápida y no necesita el procesamiento posterior del producto de PCR, lo que reduce el riesgo de contaminación.

La RT-qPCR es una variación de la PCR estándar utilizada para la cuantificación de ADN o de ARNm de una muestra. Es posible determinar el número de copias o la cantidad relativa de una determinada secuencia de ADN o ARN utilizando cebadores específicos de secuencia. Cuando la PCR a tiempo real se combina con una reacción previa de retro-transcripción, puede determinarse la cantidad de ARNm de una muestra mediante una cuantificación relativa. Se dice que es una cuantificación relativa porque se compara entre las diferentes muestras la expresión del gen objeto de

estudio respecto a la expresión de un gen constitutivo (control endógeno). Es lo que se denomina como normalización de la expresión del gen específico. Los genes más utilizados como controles endógenos son: ARNr 18S, GAPDH, beta-actina, TBP, HPRT, beta-2- microglobulina, entre otros.

La cuantificación del producto se produce mediante la adición de fluoróforos que se unen al amplicón de forma cuantitativa, a mayor producto se emitirá mayor fluorescencia. Los sistemas de RT-qPCR detectan la cantidad de fluorescencia producida en cada ciclo de RT-qPCR y los softwares de análisis representan dicha fluorescencia gráficamente respecto al número de ciclos. La cantidad de amplicón producido es proporcional al número de moléculas de ARN/ADN iniciales, de forma que en aquellas muestras con mayor expresión del gen, el amplicón fluorescente aparecerá en ciclos anteriores.

Desde el punto de vista técnico, existen dos principales métodos de análisis de PCR cuantitativa que se basan en técnicas de fluorescencia que se diferencian en la metodología de detección de los productos de RT-qPCR. Estos métodos son:

- *Sondas TaqMan*: basados en el uso de dos sondas que hibridan en las secuencias específicas.

- *SYBR Green I*: utiliza este fluorocromo intercalante que se une a la doble cadena de ADN inespecíficamente.

El método más difundido, y utilizado en nuestro experimento, es el que emplea sondas TaqMan que garantiza la obtención de ensayos de PCR altamente específicos, con una eficiencia de amplificación cercana al 100% que además permite evaluar numéricamente con la más alta precisión, la cantidad de moléculas de material genético presente en cada muestra. Estas propiedades específicas permiten la aplicación de RT-qPCR en la cuantificación absoluta y relativa de genes sin necesidad de purificar una muestra de ARN total o requerir de una gran cantidad de la misma. Esta metodología se basa en la actividad 5'-exonucleasa de la Taq polimerasa y en la amplificación mediante RT-qPCR de una determinada secuencia diana en presencia de una sonda fluorescente específica (sonda TaqMan) que hibrida con la secuencia diana que estamos amplificando. (Figura 21).

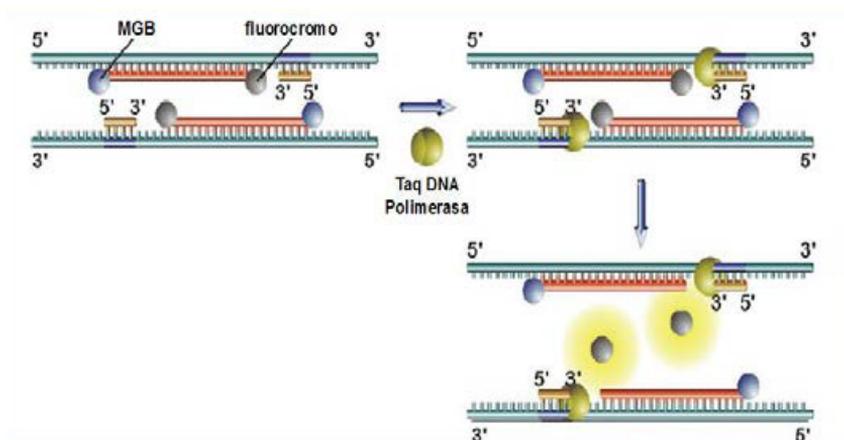


Figura 21. RT-qPCR con tecnología TaqMan. Fundamentos de la estrategia empleando sondas TaqMan. Actividad 5' exonucleasa de la Taq polimerasa.

La sonda TaqMan tiene unido un fluorocromo en posición 5' y un amortiguador de fluorescencia en posición 3' (MGB: *minor groove binder*) que se une al surco menor del ADN protegiendo a la sonda de la actividad exonucleasa de la enzima Taq polimerasa (Figura 22).

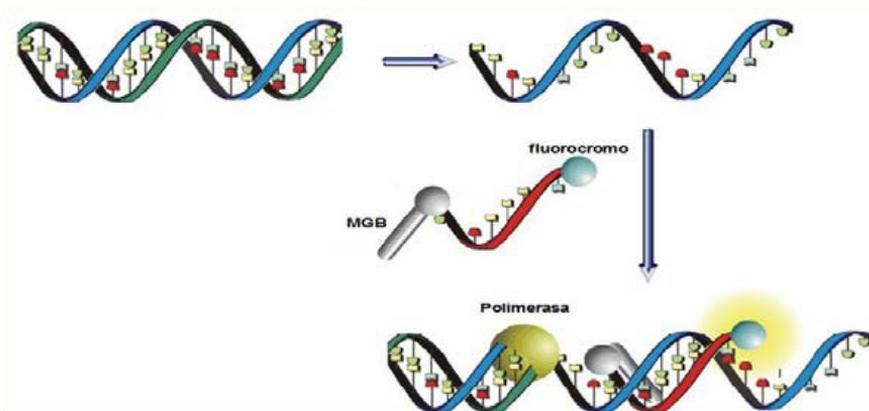


Figura 22. RT-qPCR con tecnología TaqMan. Mecanismo de acción del amortiguador de fluorescencia (MGB) en las sondas TaqMan.

Además, esta sonda está fosforilada en el extremo 3' para evitar su extensión durante la reacción de PCR. Si la secuencia diana está presente en la muestra, la sonda TaqMan hibridará específicamente con ella, situándose entre los dos cebadores. Cuando se produce la etapa de extensión en la reacción de PCR, la actividad 5'-exonucleasa de la Taq

polimerasa degradaría la sonda TaqMan liberando el fluorocromo, que al estar fuera de la influencia del amortiguador emitirá una señal que puede ser captada por el sistema óptico del equipo. Este proceso de degradación de la sonda tiene lugar en cada ciclo y no interfiere con la acumulación del producto de la RT-qPCR, por lo que se produce un incremento exponencial de la señal de fluorescencia en cada ciclo de la reacción de RT-qPCR. Otra de las ventajas es que la enzima Taq polimerasa no digiere la sonda libre sino únicamente la hibridada, por lo que la cantidad de señal fluorescente emitida es proporcional a la cantidad de producto acumulado. La medición de la intensidad de fluorescencia se realiza de forma continua, lo que nos proporciona una información dinámica en tiempo real (análisis cinético) del proceso. De esta forma podemos establecer el ciclo umbral (*Ct-cycle threshold*), es decir, el número de ciclos necesarios para que la cantidad de producto producido alcance el nivel de detección que hayamos fijado, lo que a su vez se correlaciona directamente con la cantidad de ADNc de la secuencia diana. (Figura 14).

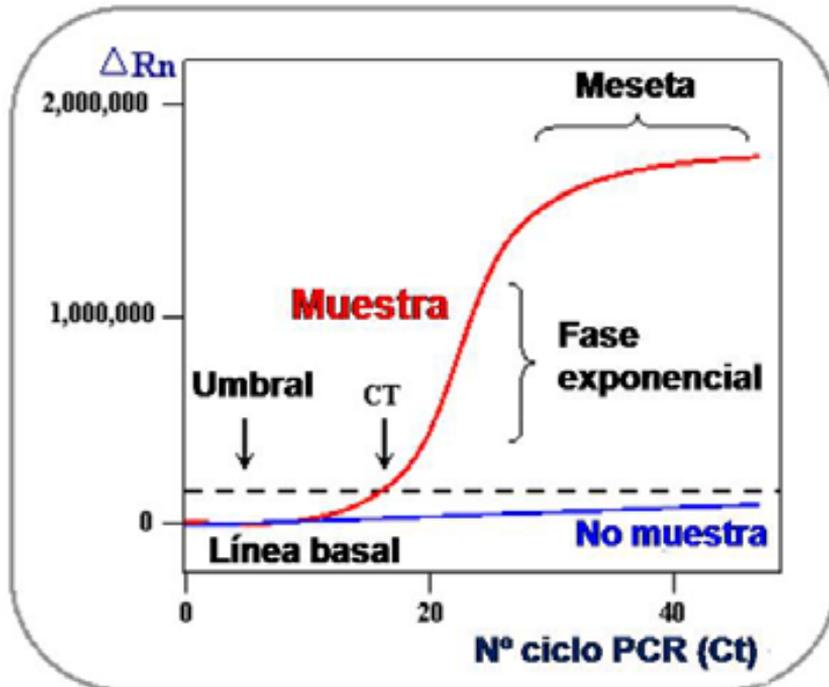


Figura 23. Modelo de RT-qPCR. Se representa el nº de ciclo de la PCR (C_t) respecto al producto de PCR (ΔR_n) de una muestra (línea roja) y de control negativo (línea azul). En la representación de la muestra, se observa el patrón típico esperado, en el que en los primeros ciclos de la PCR no hay producto, posteriormente presenta una fase exponencial llegando a alcanzar una meseta (Imagen modificada de <http://www.rt-pcr.com>).

El método utilizado para calcular la expresión relativa de un gen es el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Este método consiste en relativizar la expresión del gen en la muestra problema respecto a la muestra control, normalizando ambas con la expresión de un gen constitutivo. Para ello se sigue el siguiente procedimiento: (Figura 23)

- Cálculo del valor de ΔC_t : consiste en normalizar el valor de C_t de cada muestra respecto al control

endógeno.

$$\Delta Ct = Ct_{\text{gen}} - Ct_{\text{control endógeno}}$$

- Cálculo de $\Delta\Delta Ct$: se normaliza respecto a la muestra control o calibrador.

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{muestra problema}} - \Delta Ct_{\text{muestra control}}$$

- Cálculo de la expresión relativa ("Fold change"): representa cuántas veces más o cuántas veces menos se expresa el gen problema en la muestra bajo estudio respecto a la muestra control, relativizado a la expresión basal de un gen constitutivo. La muestra control tendrá un valor de 1, mientras que las muestras problema presentarán un valor mayor o menor de 1 dependiendo si la expresión del gen es mayor o menor respectivamente.

$$\text{Expresión relativa} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Debido a todas estas características, la metodología de la TaqMan PCR fue utilizada para el análisis de expresión génica de los marcadores de cáncer de mama seleccionados. El empleo de sondas TaqMan garantiza la obtención de ensayos de PCR altamente específicos, de una eficiencia de amplificación cercana al 100% que además

permite evaluar numéricamente con la más alta precisión, la cantidad de moléculas de material genético presente en cada muestra. El desarrollo de la técnica y la normalización y cuantificación de los resultados se llevará a cabo tal y como se ha descrito previamente y que detallamos a continuación.

Para el análisis molecular se utilizaron los cebadores 18S y SBEM así como dos marcadores más para la identificación de células humanas y células murinas específicamente en los tejidos analizados, que son HPRTh y HPRTm respectivamente (Life Technologies, Foster City, California, Estados Unidos) (figura 24). HPRTh y HPRTm son específicos de especie y amplifica una enzima que se expresa en todas las células del organismo de forma constitutiva, llamada hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa. (Figura 25).

Gen	Referencia secuencia	Exón	Longitud del amplicón
18S	Hs99999901s1	1-1	187
SBEM-1	Hs00536495m1	1-2	86
HPRTh	(Hs02800695m1)		
HPRTm	(Mm01545399m1)		

Figura 24. Cebadores (sondas Taqman) utilizados para cada uno de los genes analizados. El gen 18S fue utilizado como control de todos los demás genes.

Localización	HPRTm	HPRTh	SBEM-1
Cápsula suprarrenal izquierda	+	+	+
Tejidos con metástasis	+	+	+
Tejidos sanos	+	-	-
Posible migración de células adiposas humanas	+	+	-

Figura 25. Controles endógenos para la detección de células murinas y humanas.

Los experimentos de RT-qPCR se realizaron con el sistema ABI PRISMTM 7900 Sequence Detection (Life Technologies) previa extracción de ARN y conversión a cDNA mediante transcripción reversa de los mRNA extraídos. Como fluorocromo de unión a ADN de doble cadena se usó FAM (carboxi-fluoresceina) cuya absorbancia es de 535 a 495 nm. Para cada 10 µl de reacción TaqMan, se mezclaron 1 µl de ADNc, 3,5 µl de agua destilada libre de ARN, 5 µl de TaqMan Universal PCR Master Mix (PE Life Technologies) and 0,5 µl 20x “Assay on Demand” que contenían la sonda y los cebadores específicos para cada gen. Cada ensayo se llevó a cabo por triplicado. Las condiciones de RT-qPCR fueron las siguientes: 2 min a 50°C seguido de 10 min a 95°C para la activación enzimática, posteriormente ocurren 45 ciclos de dos pasos de 15 s a 95°C y 1 min a 60°C. Los productos

finally se analizaron con el software específico de sistema de detección de secuencias 7900HT versión 2.4 (PE Life Technologies). Los datos se representaron mediante el valor medio relativo del gen analizado y normalizado con respecto al valor correspondiente del gen de la subunidad 18S del ARN ribosómico utilizando el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

1.7. Análisis estadístico.

El análisis estadístico se llevó a cabo con el programa “SPSS statistics versión 19”. Para comprobar la distribución normal de los datos se utilizó el test de Kolmogorov-Smirnov. En función si las muestras presentaron una distribución normal o no, se realizó una comparación de medias mediante el test T para muestras independientes o la prueba de Mann-Whitney, respectivamente.

Se consideró estadísticamente significativa una $p < 0,05$ y muy significativa una $p < 0,001$.

2. Desarrollo la técnica quirúrgica de reconstrucción con grasa autóloga tras tumorectomía de mama.

2.1. Selección de pacientes.

Nuestro estudio, se llevo a cabo en la Unidad Funcional de Patología Mamaria del Hospital Universitario y Politécnico La Fe de Valencia. Fue planificado y organizado tras un estricto estudio del tema, así como una investigación concienzuda de una amplia gama de Publicaciones sobre la aplicación de injertos de grasa en la cirugía conservadora de mama y otros tipos de reconstrucción.

El estudio fue presentado al comité de expertos de la Unidad Funcional de Patología Mamaria del Hospital La Fe, y al Comité de Ética en Investigación Clínica, ambos aprobaron y apoyaron el estudio.

Selección del paciente.

A lo largo de cuatro años y medio, se han evaluado pacientes con lesiones mamarias malignas cuando se sospecha que la extirpación de la lesión sin reconstrucción supondría una retracción de la cicatriz en la mama.

Número de pacientes: 52.

Criterios de inclusión:

1. Pacientes jóvenes < de 55 años (aunque a criterio se pueden rechazar pacientes mas jóvenes).
2. Pacientes no fumadoras.
3. Pacientes no obesas.
4. Pacientes con un nivel sociocultural adecuado, valorable en la entrevista. Hay que saber decirles que no.
5. Tipo de tumor:

CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE.

6. Estadío:

T1

T2

7. Excluidos otros tipos de tumores o estadíos III o IV.

Todos los pacientes se someten a una mamografía de alta resolución, examen de ultrasonido, resonancia magnética con contraste y tumor y una biopsia antes de la cirugía.

Criterios de exclusión:

- Tumores sospechosos de casos de multicentricidad o bilaterales como el carcinoma lobular.
- Tumores con criterios histológicos de agresividad obtenidos mediante biopsia con aguja cortada (CNB) antes de la cirugía.
- Pacientes positivos para metástasis (M) y/o ganglios linfáticos (N) y pacientes con enfermedad avanzada.
- Pacientes que padecen enfermedades sistémicas distintas del cáncer de mama.

El consentimiento informado por escrito fue claramente explicado a todos los pacientes, y firmado por los incluidos en el estudio. Todos recibieron una copia escrita del consentimiento informado.

2.2. Recogida y procesamiento de muestras.

El procedimiento de extracción, procesamiento y manejo de los injertos de TA se realizó siguiendo las directrices del protocolo de Coleman, que se detallan a continuación:

Extracción: para la extracción del tejido adiposo se utilizó la metodología expuesta anteriormente en el apartado “1.2. Recogida y procesamiento de muestras” (pág 91).



Figura 26. Muestra la selección de la zona donante preoperatoria de una paciente.



Figura 27. Tubos de centrifugado grasa tras la extracción. Sistema Proteal. EEUU.

2.3. Protocolo quirúrgico.

2.3.1. Protocolo quirúrgico y desarrollo de técnica quirúrgica personal.

En el momento de empezar a aplicar nuestra idea nos encontramos que no existía una técnica quirúrgica adecuada, por lo que tuvimos que desarrollar una que cumpliera nuestros requisitos de no infiltrar grasa en la glándula, para evitar el contacto de los injertos con las posibles células tumorales que hubieran podido haber quedado.

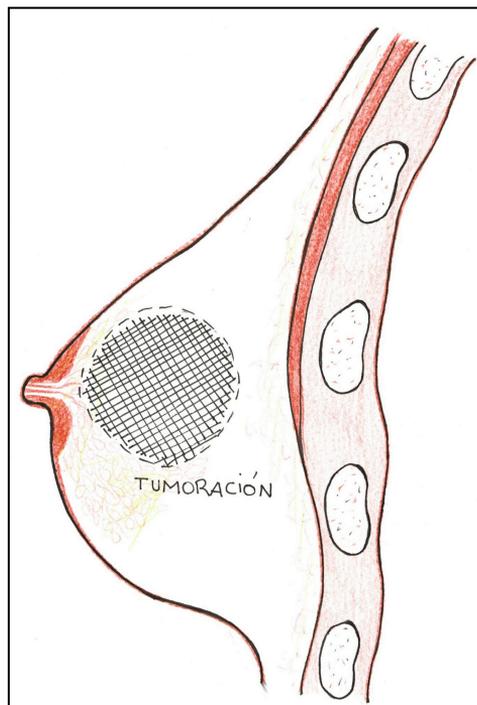


Figura 28. Representación esquemática de una tumoración de mama.

Además debía proporcionar un lecho viable al injerto graso, ya que de limitarnos a rellenar simplemente el hueco que había dejado la extirpación del tumor nos habríamos encontrado que este no hubiera podido sobrevivir y hubiera conducido únicamente a la aparición de un absceso.

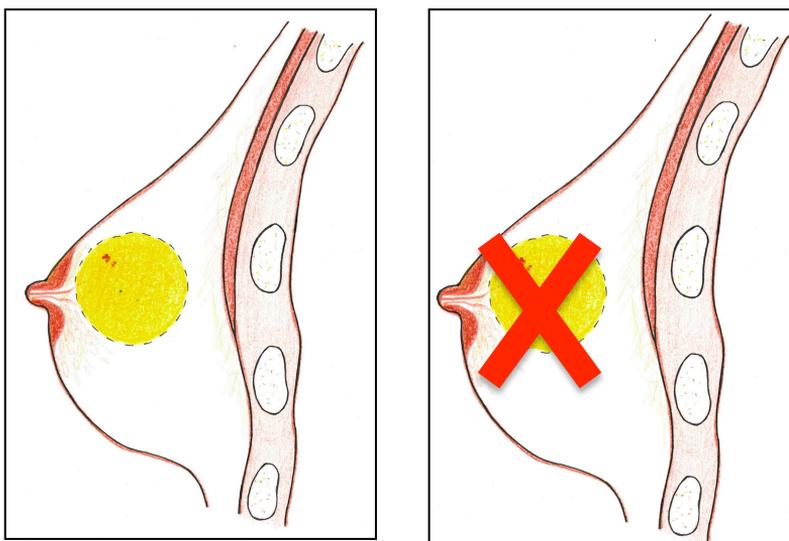


Figura 29. Se demuestra que el simple relleno de la cavidad produciría la pérdida del injerto y la aparición de un absceso.



Figura 30. Se observa la pieza de tumorectomía de la paciente puesta de ejemplo. Nótese que es de gran tamaño, mostrando las posibilidades de reconstrucción de zonas de volumen considerables.

Esta técnica consiste en realizar una tumorectomía dependiendo de los requisitos oncológicos. Después de eso, la cavidad creada dentro de la mama después de la resección del tumor es meticulosa y herméticamente cerrada por medio de algunas puntadas absorbibles como suturas de Vicryl.

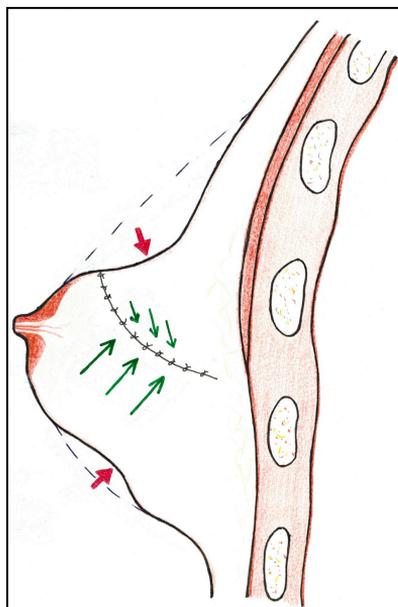


Figura 31. Se muestra cómo el cierre hermético de la cavidad con suturas de vicryl provoca deformidades en la mama a distancia de donde se encontraba el foco tumoral, tal y como señala la dirección de las flechas.

Esta maniobra de tracción al centro del defecto causa algunas deformidades y distorsiones importantes en la superficie de la mama, distante del lecho tumoral. Fotografía de caso real (figura 32).



Figura 32. Esta misma maniobra en el paciente real, nótense las zonas deprimidas arriba y debajo de la areola.



Figura 33. Se observa otro ejemplo de retracciones a distancia de la zona de la tumorectomía que es donde se realizaran los injertos de grasa.



Figura 34. Se puede ver el resultado final a largo plazo de la misma paciente. Nótese que los defectos han desaparecido.

A continuación, se suturan las incisiones utilizadas para la infiltración así como las utilizadas para la cosecha con monofilamento 6/0. Finalmente, un vendaje elástico y los apósitos *Mepore* son aplicados y reemplazados tres días después por un sujetador deportivo de alta compresión para lograr la mayor inmovilización del injerto, lo cual es vital para asegurar su subsistencia.

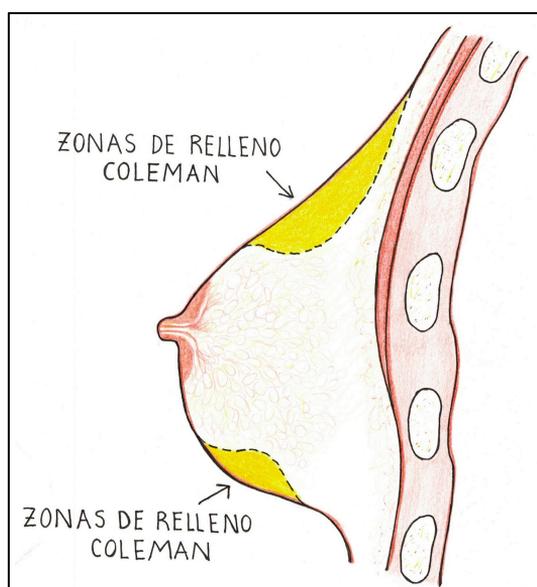


Figura 35. Se demuestra la forma correcta diseñada por nosotros para la corrección de una deformidad de tumorectomía.

Simultáneamente, otro equipo quirúrgico procede a cosechar tejido graso mediante una técnica a traumática utilizando una cánula similar a ColemanTM. Después de llevar a cabo esta fase con todas sus posibles variaciones, y especialmente a medida que se conoce más información sobre el injerto de

grasa autóloga , realizamos el siguiente método: se retira el tejido adiposo con una jeringa de 20 cm² y se decanta durante 10- 15 minutos. Luego, expulsamos la fracción líquida y llevamos a cabo cuatro lavados en serie con solución salina normal en la jeringa. Así es como conseguimos una fracción de grasa completamente limpia, de color amarillo, sin sangre residual, y sólo formada por su fracción estromal y celular. Este contenido se transfiere a las jeringas después de eliminar la fracción oleosa del conjunto.

El promedio \pm DP de infiltración de grasa fue de $65 \pm 19,30$ cm² dependiendo de la necesidad, utilizando la técnica de túneles múltiples en las áreas deformadas creadas al cerrar el área de lumpectomía, pero distanciadas de ella.

A continuación, se suturan las incisiones utilizadas para la infiltración así como las utilizadas para la cosecha con monofilamento 6/0. Finalmente, un vendaje elástico y los apósitos Mepore son aplicados y reemplazados tres días después por un sujetador deportivo de alta compresión para lograr la mayor inmovilización del injerto, lo cual es vital para asegurar su subsistencia.

2.4. Seguimiento de las pacientes.

2.4.1. Seguimiento radiológico.

OBJETIVOS DEL ESTUDIO RADIOLÓGICO.

Evaluar los cambios radiológicos tempranos (al año) y tardíos (tras 3 años) producidos en la mama tras la reconstrucción inmediata mediante lipofilling.

Todos los pacientes incluidos en este estudio tenían RMN preoperatoria, mamografía de alto contraste y ECO específica realizada en una unidad de radiología en exclusiva a realizar estudios de la mama.

A los estudios previos a la cirugía se añadió el control específico de este estudio que consistió en repetir la RMN, la ECO y la mamografía al año de evolución con el fin de objetivar:

- Posibles recidivas mediante la presencia de algún patrón de captación de características malignas u otros signos que detecten la reaparición de el proceso tumoral.
- Medición de volúmenes y valoración de la persistencia de los mismos.
- Aparición de lesiones radiológicas que se puedan atribuir al tratamiento recibido para saber en el futuro que se puede esperar tras estos tratamientos.

Así pues, se diseñó este estudio de forma prospectiva para que tuviera mas valor, que tuvo lugar durante cinco años que es el periodo del paciente de máximo periodo de seguimiento.

A los tres años se realizó una nueva valoración de los pacientes que persistían en el estudio que eran 33 que habían cumplido con el seguimiento. Esa sólo incluyó Mamografía y Ecografía.

Todas las exploraciones incluidas estas postoperatorias y a largo plazo fueron realizadas por el mismo equipo de expertos de radiología de el Hospital La Fe.

RESUMEN DE MATERIAL Y MÉTODOS DEL SEGUIMIENTO RADIOLÓGICO.

- **Estudio observacional prospectivo.**
- **Desde Enero 2010 hasta Noviembre 2015.**
- **Evaluación de todas las alteraciones radiológicas observadas.**
- **Mx, ECO, RMN antes de la cirugía y 12 meses PO.**
- **Posteriormente: Mx + ECO cada año.**
- **Seguimientos más largos: 5 años.**

:: RESULTADOS

::RESULTADOS

VI. RESULTADOS.

1. Efecto del TA en el desarrollo de metástasis en CM.

1.1. Tasa de supervivencia.

Sólo los ratones de control negativo (grupo C) alcanzaron los 7 meses tras la inoculación de las células y fueron sacrificados.

El grupo A tenía el rango de supervivencia más corto (153.2 ± 22.6), pero no se obtuvieron ningunas diferencias significativas comparado con el grupo B (162.0 ± 23.4). No se observó relación entre los días de supervivencia de los tres grupos experimentales y el donante de donde vino el tejido. (Figura 36).

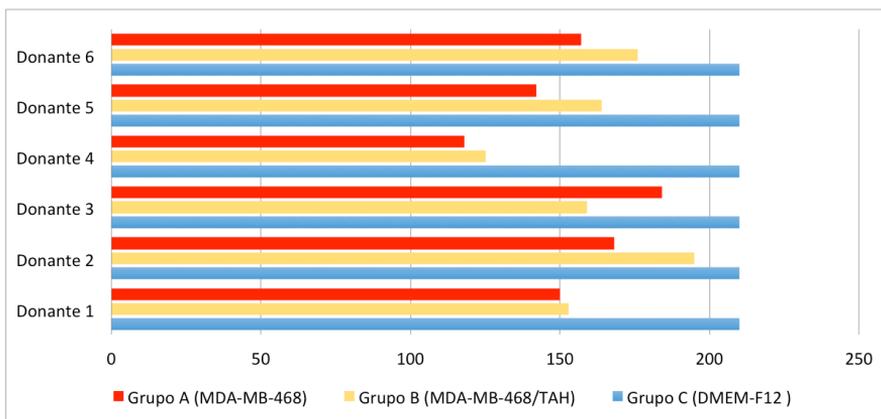


Figura 36. Rangos de supervivencia. Gráfica representativa de los días de supervivencia de los animales dependiendo del grupo experimental y el donante HAT.

1.2. Examen macroscópico.

Después de la muerte o sacrificio del animal se realizó un estudio macroscópico para evaluar posibles alteraciones viscerales (Figura 37). Los ratones de los grupos A (Figura 37A y 37B) y B mostraron una inflamación abdominal prominente, causada por la presencia de tumor en el riñón izquierdo 6bh donde se habían inyectado células metastásicas (Grupo A) y una mezcla de células metastásicas con HAT (grupo B) (Figura 37D). El riñón izquierdo de estos grupos estaba completamente invadido por la masa tumoral (Figura 37D). No se observaron diferencias significativas en el diámetro tumoral entre los grupos A ($2,2 \pm 0,2$ mm) y B ($2,1 \pm 0,2$ mm). La mayoría de los animales de los grupos A y B presentaron lesiones morfológicas macroscópicas como inflamación y / o color alterado en el hígado, el bazo, el riñón izquierdo y el páncreas. Sin embargo, los ratones control (grupo C) que sólo habían recibido el medio de inoculación no mostraron ningún resultado morfológicamente anormal o crecimiento tumoral. (Figura 37C).

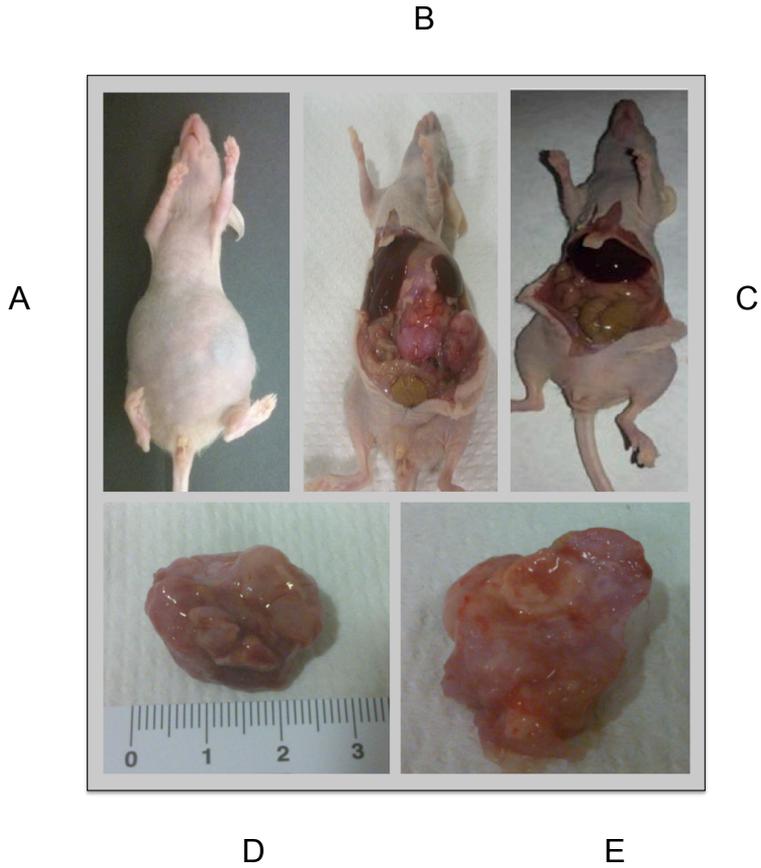


Figura 37. A; B; C; D; E: Estudio macroscópico de las posibles alteraciones viscerales. Ratones en los que se inocularon células MDA-MB-468, presentaron inflamación abdominal (A) y desarrollo tumoral (B, C). Riñón izquierdo completamente invadido por la masa tumoral procedente de un animal inoculado con células MDA-MB-468 y TAH (D, E).

1.3. Estudio del desarrollo metastásico in vivo.

El inicio del proceso metastásico se observó después del día 37 después de la inyección en el grupo A y después del día 44 en el grupo B, mostrando signos de metástasis bilateral después del día 104 (grupo A) y el día 111 (grupo B). No se encontraron diferencias significativas entre el inicio de la metástasis y la extensión cuando se compararon ambos grupos. (Figura 38).

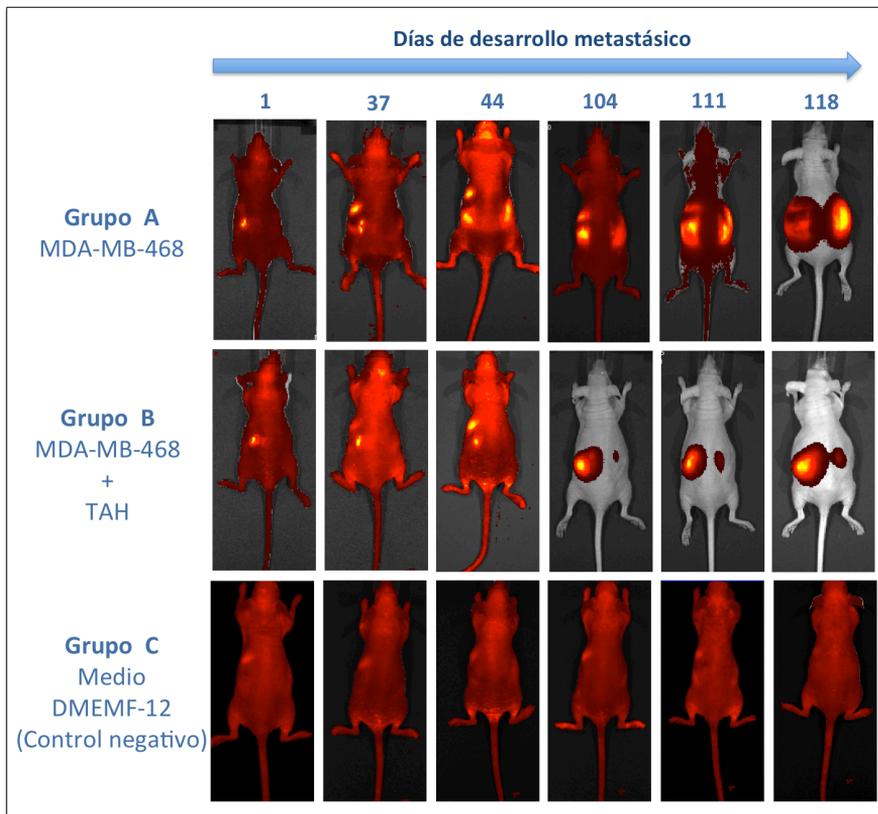


Figura 38. Desarrollo metastásico in vivo.

1.4. Detección de micrometástasis por estudios moleculares.

Con el fin de detectar la micrometástasis de origen humano en los órganos analizados de los diferentes grupos experimentales, se llevó a cabo la expresión genética humana de SBEM-1, como marcador molecular metastático. El panel molecular incluyó el análisis de la expresión génica de HPRT_h (humano) y HPRT_m (ratón).

La línea celular de cáncer de mama humano MDA-MB-468 presentó la expresión de SBEM-1 y HPRT_h que era negativa para HPRT_m. Estos resultados confirmaron el MDA-MB-468 como característica de la línea celular de cáncer de mama y su origen humano respectivamente. (Figura 39).

	Expresión Relativa (Δ Ct)		
	HPRT _h	HPRT _m	SBEM
MDA-MB-468	4,13 ± 0,41	-	20,16 ± 0,63

Figura 39. Expresión relativa de los marcadores moleculares en cultivo celular de MDA-MB-468 antes de ser inyectado en los animales.

Las muestras de TAH, procedente de 6 donantes, que fueron utilizadas en este estudio presentaron expresión del marcador endógeno HPRT_h confirmando así su origen humano. No se obtuvo expresión del marcador endógeno de origen murino HPRT_m ni de SBEM-1 confirmando la

ausencia de contaminación por células del animal antes de su inoculación y la ausencia de características de origen canceroso en el TAH. (Figura 40).

Expresión Relativa (ΔCt)			
	HPRTh	HPRTm	SBEM
TAH donante-1	19,53	1	1
TAH donante-2	17,49	1	1
TAH donante-3	20,62	1	1
TAH donante-4		1	1
TAH donante-5		1	1
TAH donante-6	24,08	1	1

Figura 40. Expresión relativa de los marcadores moleculares en las muestras de TAH antes de ser inyectado en los animales.

Los animales del grupo A (Figura 40) mostraron una expresión positiva de HPRTh y SBEM-1 en bazo (50%), hígado (33,3%), páncreas (16,7%), riñón derecho (66,7%) y masa tumoral que había engullido el riñón izquierdo (100%). El 100% de los tejidos analizados expresaron HPRTm.

	HPRTm	HPRTh	SBEM-1	HPRTm	HPRTh	SBEM-1
	N	Expresión relativa (Δ Ct)	N	Expresión relativa (Δ Ct)	N	Expresión relativa (Δ Ct)
Bazo	100%	11,15 \pm 2,54	50%	19,92 \pm 2,64	50%	7,36 \pm 2,82
Hígado	100%	15,03 \pm 2,17	33,3%	16,49 \pm 2,35	33,3%	15,1 \pm 10,64
Páncreas	100%	13,79 \pm 2,62	16,7%	12,35 \pm 0,3	16,7%	7,37 \pm 1,36
Riñón derecho	100%	13,30 \pm 1,66	66,7%	17,66 \pm 1,92	66,7%	8,32 \pm 5,09
Riñón izquierdo/Tumor	100%	12,16 \pm 2,25	100%	18,36 \pm 2,03	100%	15,39 \pm 3,04

Tabla 41. Expresión relativa de los marcadores moleculares en las muestras del Grupo A pertenecientes a animales que se les había inoculado la línea celular de CM metastásico MDA-MB-468.

Los animales del grupo B (Figura 41) presentaron expresión positiva de HPRTh y SBEM-1 en el bazo (66,7%), hígado (33,3%), riñón derecho (50%) y masa tumoral del riñón izquierdo (100%); Sin embargo, no hubo expresión en el páncreas.

	HPRTm	HPRTh	SBEM-1	HPRTm	HPRTh	SBEM-1
	N	Expresión relativa (Δ Ct)	N	Expresión relativa (Δ Ct)	N	Expresión relativa (Δ Ct)
Bazo	100%	12,30 \pm 2,29	66,7%	19,25 \pm 1,61	66,7%	7,99 \pm 3,62
Hígado	100%	14,84 \pm 3,04	33,3%	20,11 \pm 1,06	33,3%	12,93 \pm 0,71
Páncreas	100%	14,15 \pm 2,26	0%	1,00	0%	1,00
Riñón derecho	100%	12,44 \pm 3,42	50%	15,76 \pm 2,43	50%	11,98 \pm 0,52
Riñón izquierdo/Tumor	100%	13,26 \pm 2,70	100%	16,91 \pm 2,70	100%	14,82 \pm 5,43

Figura 42. Expresión relativa de los marcadores moleculares en las muestras del Grupo B pertenecientes a animales que se les había inoculado la línea celular de CM metastásico MDA-MB-468 junto con TAH.

Los diferentes órganos analizados de ratones del grupo C:

	HPRTm	HPRTh	SBEM-1	HPRTm	HPRTh	SBEM-1
	N	Expresión relativa (Δ Ct)	N	Expresión relativa (Δ Ct)	N	Expresión relativa (Δ Ct)
Bazo	100%	12,48 \pm 2,36	0%	1,00	0%	1,00
Hígado	100%	14,82 \pm 2,53	0%	1,00	0%	1,00
Páncreas	100%	14,17 \pm 2,27	0%	1,00	0%	1,00
Riñón derecho	100%	13,05 \pm 2,41	0%	1,00	0%	1,00
Riñón izquierdo	100%	13,35 \pm 2,12	0%	1,00	0%	1,00

(control negativo) (Figura 42) sólo expresaron HPRTm.

Figura 43. Expresión relativa de los marcadores moleculares en las muestras del Grupo C pertenecientes a animales que solamente se les había inoculado el medio DMEM-F2.

Ninguna de las muestras analizadas mostró al mismo tiempo una expresión positiva de HPRTh y HPRTm y una expresión negativa de SBEM-1, lo que confirma que no hubo migración de células grasas a otros tejidos. (Figura 43).

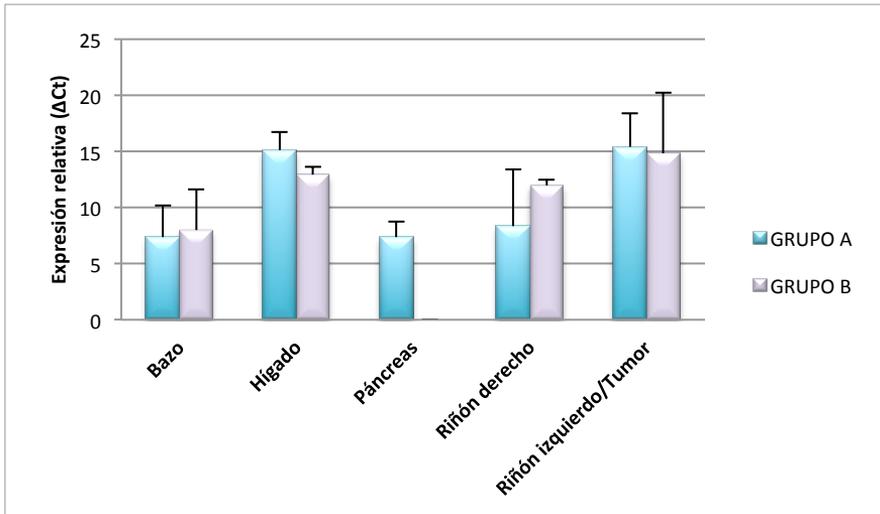


Figura 44. Gráfica comparativa de la expresión relativa del marcador tumoral SBEM-1 en los dos grupos experimentales A y B según los órganos afectados.

1.5. Confirmación metastásica por estudios de expresión proteica.

La expresión de SBEM-1 como marcador de cáncer de mama también se analizó a nivel de proteína. (Figura 44).

Los resultados corroboraron los estudios moleculares realizados anteriormente. Se observó inmunotinción positiva en bazo (3/6 ratones) (Figura 45 A), hígado (2/6 ratones) (Figura 45 B), páncreas (2/6 ratones) (Figura 45 C), riñón derecho (4/6 ratones) (Figura 45 D), y masa tumoral del riñón izquierdo (6/6 ratones) (Figura 45 E y F) de los animales del grupo A. Los ratones del grupo B mostraron inmunotinción positiva en bazo (4/6 ratones) (Figura 45 G) (Figura 45 H),

riñón derecho (3/6 ratones) (Figura 45 I) y masa tumoral renal izquierda (6/6 ratones) (Figura 45 J), pero la tinción fue negativa en el páncreas de este grupo (Figura 45 K). No inmunomarcación se observó en los tejidos del grupo C (Figura 45 L).

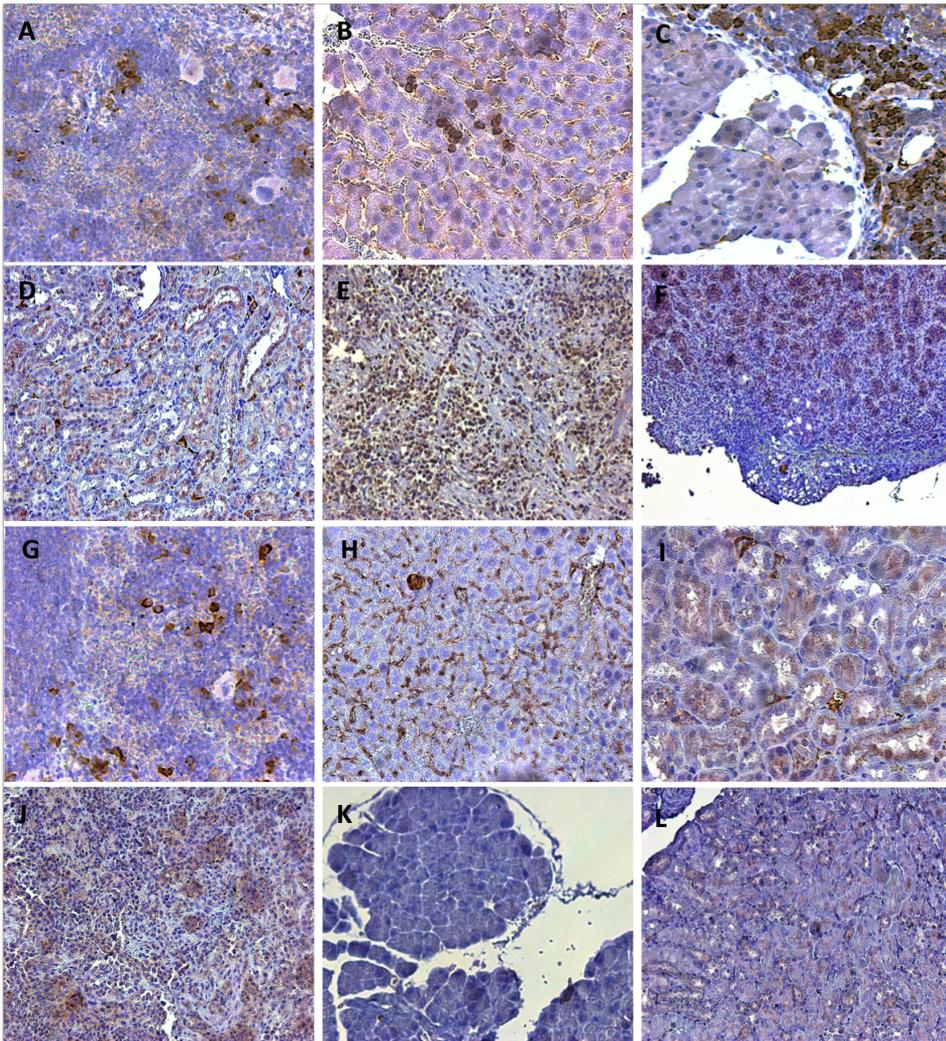


Figura 45: confirmación de micrometástasis mediante expresión de la proteína SBEM. Ratón del Grupo A con micrometástasis y SBEM + inmunotinción en el bazo (A), hígado (B), infiltración tumoral pancreática (C) y riñón derecho (D). La masa tumoral SBEM + se desarrolló en el riñón izquierdo donde se inocularon células cancerosas (E y F). El ratón del grupo B presentó micrometástasis en las que la inmunotinción SBEM fue positiva en el bazo (G), el hígado (L), el riñón derecho (I) y la masa tumoral renal izquierda (J), pero no se observó inmunotinción a nivel pancreático (K). Ratón del grupo C: riñón izquierdo (L), SBEM negativo.

2. Resultados del estudio clínico de reconstrucción mamaria inmediata tras tumorectomía de mama mediante autoinjertos grasos.

2.1. Análisis descriptivo de la situación de las pacientes pre-cirugía.

Un total de 52 pacientes oncológicas diagnosticadas de CM fueron incluidas en este estudio, con una media de edad en el momento de la cirugía de $39,7 \pm 8,4$ años y rango de 21,6 a 54,8.

La mama derecha se vio afectada en un 52% de los casos mientras que la izquierda sólo lo fue en el 48%. (Figura 46).

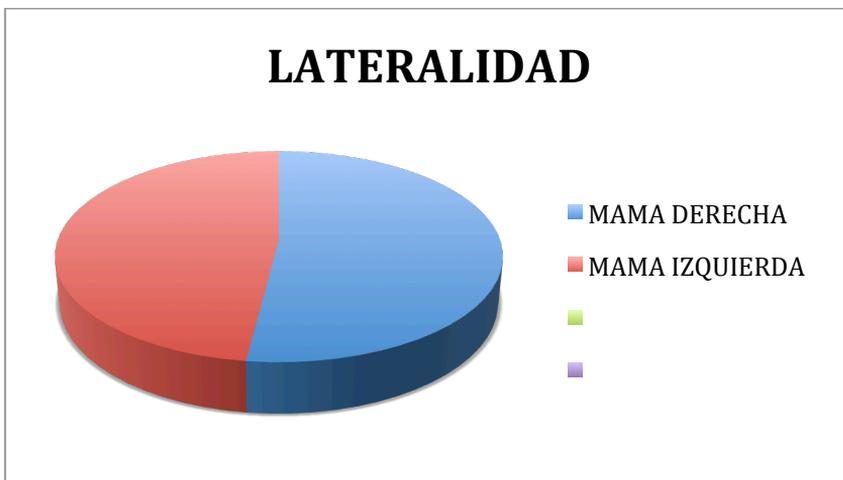


Figura 46. Gráfica del porcentaje de la distribución de pacientes incluidas en el estudio según la localización del tumor.

Por motivos de selección de los pacientes según criterios de inclusión, se seleccionaron únicamente T1 y T2, sin adenopatías ni metástasis a distancia. De ellos, la mayoría fueron T2, ya que en algunos T1 si la mama era de cierto tamaño se descartaba la reconstrucción por presentar poca repercusión estética. Por lo tanto, se seleccionaron pacientes cuyo cociente tumor/volumen total de la mama fuera una cifra alta, cuanto mas cercana al uno mejor. (Figura 47).



Figura 47. Gráfica del porcentaje de la distribución de pacientes incluidas en el estudio según el grado tumoral.

2.2.- Análisis de las complicaciones quirúrgicas.

Del total de las 52 pacientes incluidas en el estudio, 23 (44,2%) de ellas no presentaron ninguna complicación post-quirúrgica tras la intervención, constituyendo así el grupo mayoritario. Un total de 9 (17,3%) pacientes presentaron complicaciones agudas, 17 (32,7%) complicaciones crónicas y 3 (5,8%) ambas (Figura 48).

De todas las complicaciones la mas frecuente fue la hemorragia postoperatoria leve, manifestándose como tumefacción y equimosis local. Mucho mas lejana en proporción encontramos la infección leve que cedió con antibióticos usuales. A largo plazo la mas frecuente fue la formación de quistes oleosos palpables que dieron algún susto a las pacientes y en menos ocasiones la presencia de una fibrosis severa que obligó a la punción biopsia. (Dos casos).

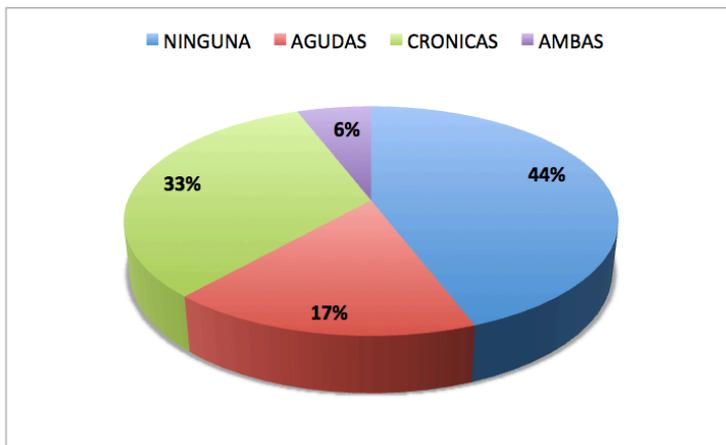


Figura 48. Gráfica del porcentaje de la distribución del total de las pacientes incluidas en el estudio según las complicaciones tras la cirugía.

2.2.1.- Complicaciones quirúrgicas en función de la edad de la paciente.

El número total de pacientes fue dividido en dos grupos según la media de edad (39,7 años), correspondiendo al grupo A las pacientes cuya edad fue $\leq 39,7$ años (n=24) y al grupo B aquellas $> 39,7$ años (n=28) en el momento de la cirugía. (Figura 49).

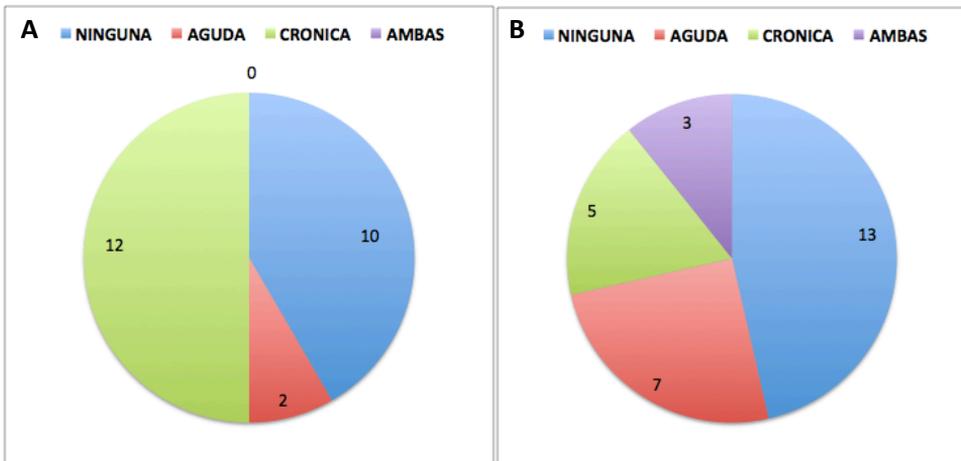
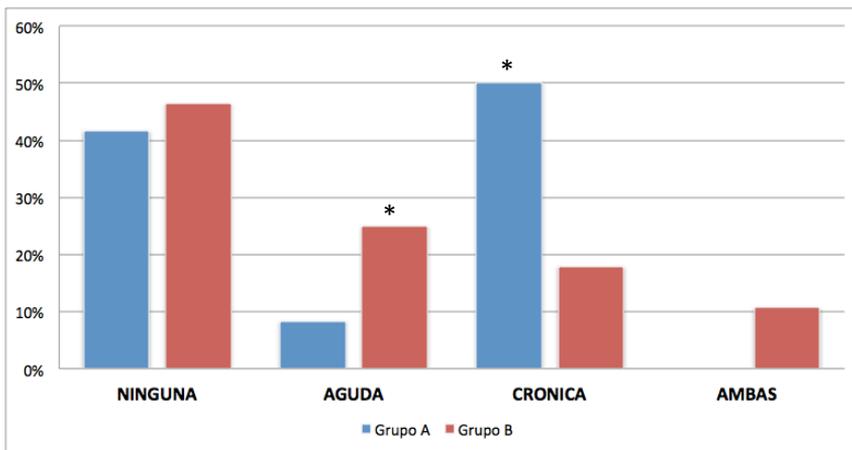


Figura 49. Gráfica de la distribución de las pacientes incluidas en el estudio según edades y complicaciones tras la cirugía. A: Pacientes del grupo A ($>39,7$ años). B. Pacientes del grupo B ($\leq 39,7$ años).

No se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p=0,73$) en las pacientes sin ninguna complicación post-cirugía en función de la edad. Sin embargo, en los grupos con complicaciones post-quirúrgicas, presentaron un aumento estadísticamente significativo de complicaciones

agudas ($p=0,019$) las pacientes $>39,7$ años (25,0%; grupo B) respecto a las $\leq 39,7$ años (8,3%; grupo A). Por otro lado, las pacientes el grupo A presentaron un aumento estadísticamente significativo ($p=0,014$) de complicaciones crónicas (50,0%) en comparación con las pacientes del grupo B (17,9%). No se observaron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la presentación de ambas complicaciones entre las pacientes del grupo A (0,0%) y grupo B (10,7%). (Figura 50).



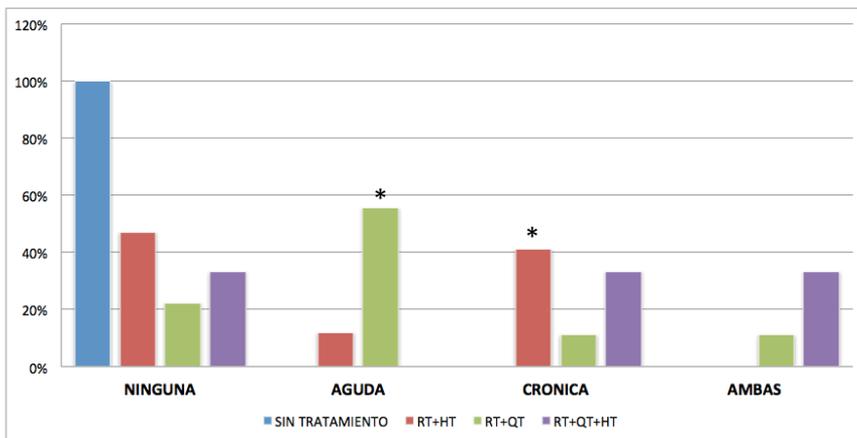
*Figura 50. Gráfica comparativa de las pacientes incluidas en el estudio según edades y complicaciones tras la cirugía. * $P<0,05$.*

2.2.2.- Complicaciones quirúrgicas en función de la adyuvancia.

No se observaron diferencias estadísticamente significativas en las pacientes sin ninguna complicación post-cirugía ($p=0,114$) o complicación crónica ($p=0,214$) en función de la adyuvancia. Sin embargo, se observó un aumento

estadísticamente significativo de complicaciones agudas ($p=0,008$) en las pacientes que habían recibido RT+QT (55,6%) respecto a las que habían recibido RT+HT (11,8%), RT+QT+HT (0,0%) o ninguna terapia adyuvante (0,0%). (Figura 51).

Por otro lado, las pacientes el grupo A presentaron un aumento estadísticamente significativo ($p=0,014$) de complicaciones crónicas (50,0%) en comparación con las pacientes del grupo B (17,9%). No se observaron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la presentación de ambas complicaciones entre las pacientes del grupo A (0,0%) y grupo B (10,7%). (Figura 51).



*Figura 51. Gráfica comparativa de las pacientes incluidas en el estudio según edades y terapia adyuvante. * $P<0,05$.*

2.3.- Análisis de recidivas.

El 100% de las pacientes incluidas en este estudio **no presentaron recidiva** tras la reconstrucción mamaria inmediata con autoinjertos grasos según técnica personal del autor, tras tumorectomía por cáncer de mama.

2.4.- Resultados de los estudios radiológicos.

En el análisis de las pruebas radiológicas realizadas, se hallaron lesiones características de la aplicación de injertos grasos. La relación de las lesiones que se hallaron es la siguiente:

- **Quistes oleosos simples.**
- **Quistes grasos.**
- **Quistes compuestos o quistes oleosos compuestos.**
- **Macrocalcificaciones.**
- **Microcalcificaciones dispersas no agrupadas.**
- **Alteraciones de la arquitectura mamaria.**

QUISTES OLEOSOS o lipodicos. Suelen ser consecuencia de la realización de un lipofilling mamario, sea por estética o por reconstrucción, son quistes que pueden llegar a tener un tamaño considerable, con varios centímetros

de diámetro. Forma lobulada y contenido radiolúcido, que pueden estar rodeados de una zona hiperecoica (brillante a la visualización ecográfica) que corresponde a la zona reactiva fibrosa del organismo. No requieren ningún tipo de seguimiento adicional. (Figura 52).

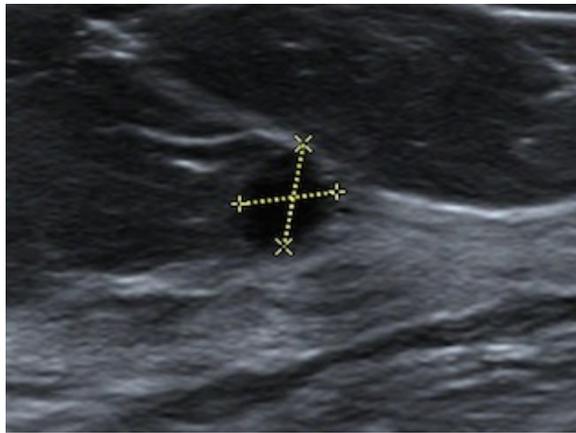


Figura 52. Quiste oleoso simple característicamente homogéneo y menor de 10 mm de diámetro.

QUISTES OLEOSOS COMPLEJOS (CITOESTEATONECROSIS).

Característicamente corresponden a quistes de mayor tamaño que presentan una reacción inflamatoria a su alrededor visualizable mediante una zona ecodensa. Particularmente son mayores que los quistes simples superando los 10 mm. (Figura 53 y 54).

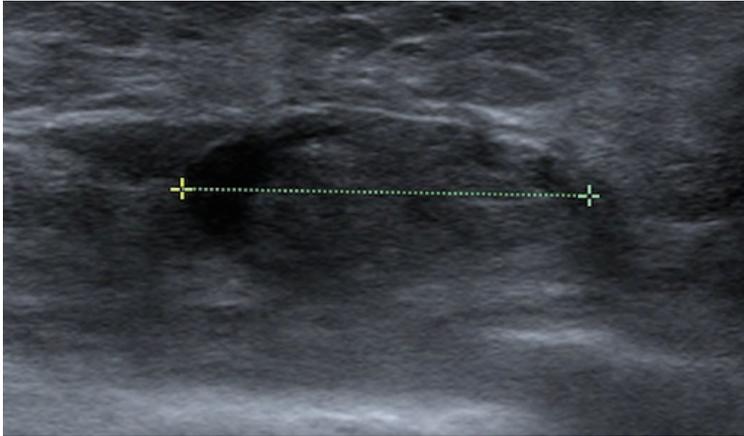


Figura 53. Quistes oleosos complejos (>10mm, heterogéneos..) = "Citoesteatonecrosis" visualizados mediante ecografía.

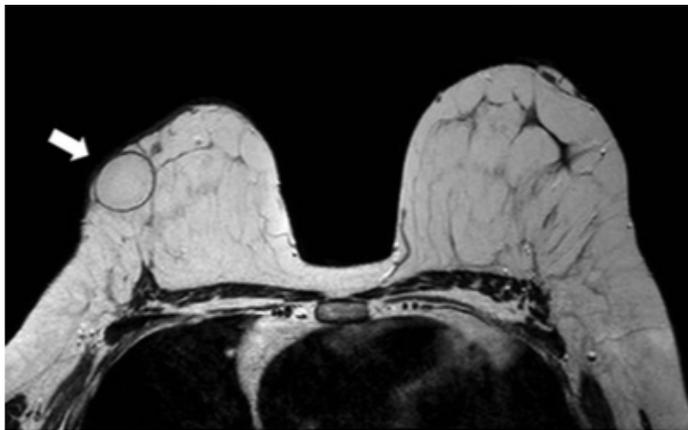


Figura 54. La misma lesión vista por resonancia magnética.

CALCIFICACIONES. Se ha visto la aparición de lesiones por depósito de calcio en una gran cantidad de

pacientes que han sido sometidas a un autoinjerto graso. Tras varios años de episodios de alarma, muchas publicaciones acabaron demostrando que el depósito de calcio que se puede producir lo constituyen macrocalcificaciones, que a los ojos de un radiólogo son fácilmente diferenciables de las microcalcificaciones que se producen en la aparición de la mayoría de las neoplasias malignas. Clásicamente se pueden presentar de dos formas:

- **Microcalcificaciones.** Podrían suponer la posible confusión con las microcalcificaciones malignas. En este caso se presentan como lesiones puntiformes y no agrupadas, lo que permite diferenciarlas sin problemas. (Figura 55)

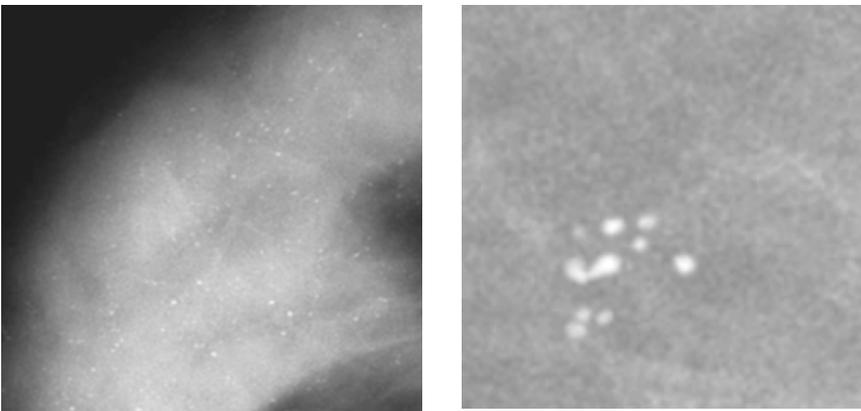


Figura 55. Lesiones puntiformes benignas

- **Macrocalcificaciones:** Presentan una morfología clásica en forma de acúmulos de calcio groseros de carácter distrófico como en palomitas de

maíz (clásicamente del inglés, en “pop corn”). (Figura 56).

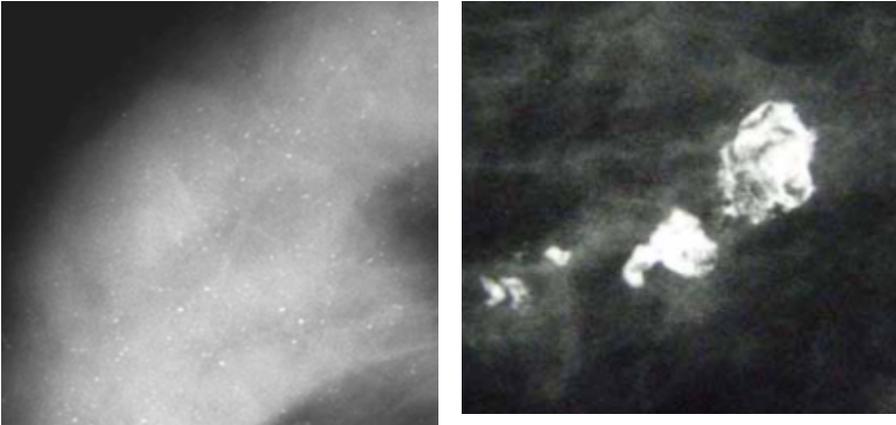


Figura 56. Calcificaciones groseras o macrocalcificaciones.

QUISTES GRASOS. Se observan fundamentalmente en RMN y en menor medida en ECO, constituyen lesiones rodeadas por un halo radiolúcido cuyo interior tiene una densidad similar la de la grasa o ligeramente hipo o hiper densa. (Figura 57).

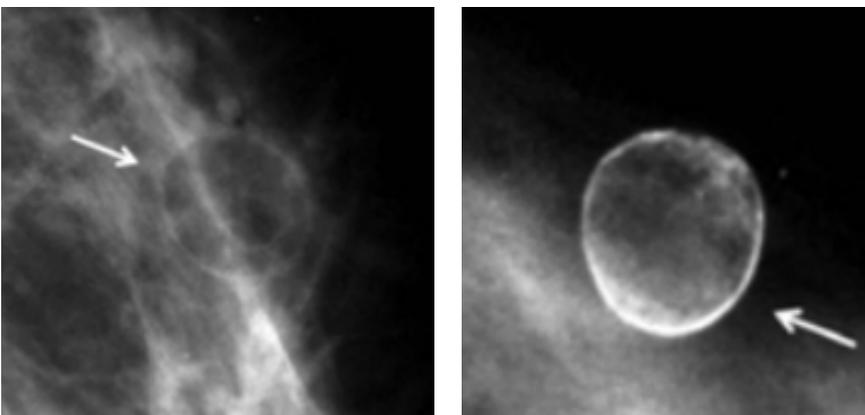


Figura 57. Quistes grasos visualizados mediante mamografía.

Los hallazgos de cada una de estas lesiones se agrupó en dos grupos, el primero en el estudio radiológico que se realizó al año de resonancia magnética, ecografía específica y mamografía. Los hallazgos que se obtuvieron para cada prueba en concreto fueron los siguientes:

CAMBIOS RADIOLÓGICOS TEMPRANOS (AL AÑO):

52 PACIENTES

ECOGRAFÍA

El hallazgo más frecuente consistió en el **quiste lipídico simple o quiste oleoso** (en inglés “oil cyst”), reconocible por ser lesiones densidad agua, de pequeño tamaño (menor de un centímetro) que no están rodeados de ningún halo esclerótico o radiolúcido, corresponden simplemente a acúmulo de líquido intraparenquimatoso. Este hallazgo se produjo en 31 de los pacientes estudiados, lo que corresponde al 59% de los mismos.

En menor proporción se hallaron quistes lipídico complejos o mayores de 10 mm y que generalmente se acompañan de cierta reacción inflamatoria en periferia correspondiente a la zona donde el sistema inmunológico intenta retirar los restos celulares de los adipocitos muertos, lo que genera reacción inflamatoria con fibrosis posterior. Este hallazgo lo encontramos en 17 de los pacientes, lo que constituye un 32% de la totalidad.

No se encontraron lesiones que pudieran suponer ninguna duda diagnóstica en cuanto a su posible malignidad.

ALTERACIÓN RADIOLÓGICA	Número de pacientes	% Pacientes
QUISTES LIPÍDICOS SIMPLES (<10 mm)	31	59,4 %
QUISTES LIPÍDICOS COMPLEJOS = LIPONECROSIS (>10 mm)	17	32,4 %
SUGESTIVA DE MALIGNIDAD	0	0 %

Figura 58. ECOGRAFÍA. En esta tabla se resumen los hallazgos ecográficos obtenidos al año de evolución en el grupo completo de 52 pacientes.

CAMBIOS RADIOLÓGICOS TEMPRANOS (AL AÑO):

52 PACIENTES

MAMOGRAFÍA

HALLAZGOS MAMOGRÁFICOS.

La visualización de calcificaciones es lo mas relevante del análisis de las mamografías de estos pacientes, en menor grado también se obtuvo visualización de quistes grasos.

En ellas se apreció la presencia de calcificaciones pequeñas y no agrupadas en 25 pacientes, lo que supone un 48,6% de la totalidad. Estas calcificaciones son características de los procesos inflamatorios y no inducen a error diagnóstico. (Figura 59).

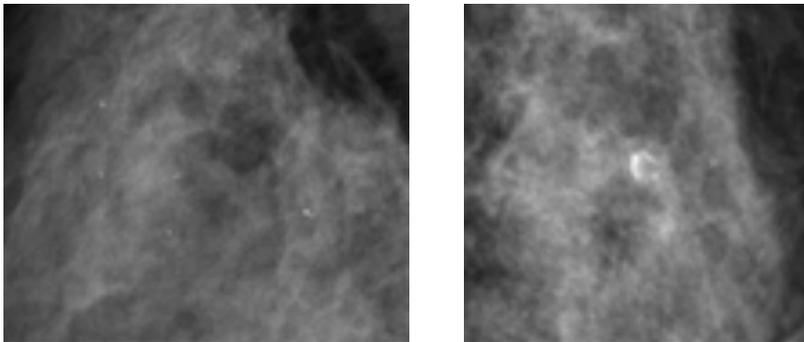


Figura 59. Microcalcificaciones puntiformes detectadas mediante mamografía.

Un total de 8 pacientes, lo que supone un 16,2% del total, presentó **macrocalcificaciones**, que son lesiones que corresponden a la necrosis celular y se presentan como acúmulos gruesos de calcio en forma de palomita de maíz (pop corn) y que están dispersos, nunca adquieren carácter agrupado. (Figura 60).

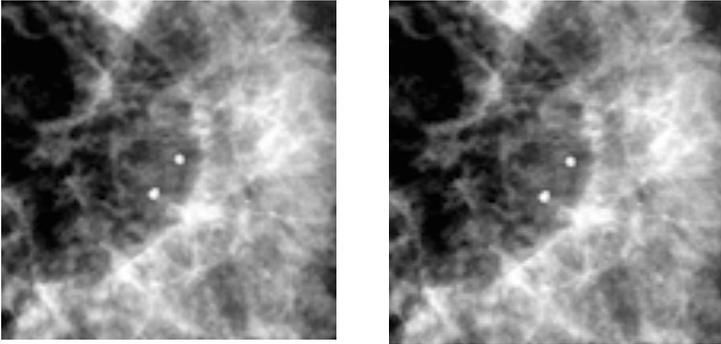


Figura 60. Macrocalcificaciones en palomita de maíz o pop corn. Halladas mediante mamografía al año de evolución.

El otro hallazgo mamográfico consistió en quistes grasos, que son lesiones de densidad similar a la grasa, pero que se visualizan bien por estar rodeadas de un halo radiolúcido. (Figura 61 y 62).

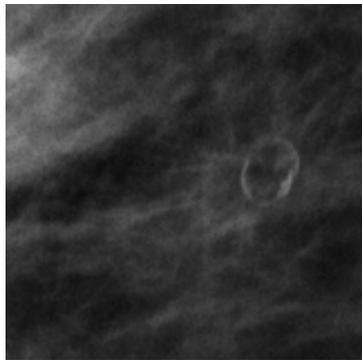


Figura 61. Quiste graso obtenido mediante mamografía al año de evolución.

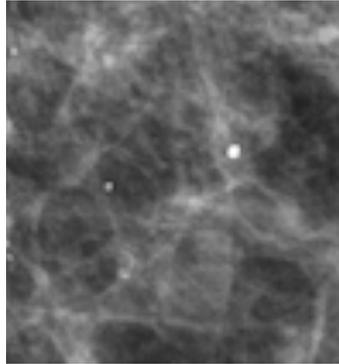


Figura 62. Se aprecia quiste graso en combinación con calcificaciones distróficas tipo palomita de maíz.

ALTERACIÓN RADIOLÓGICA	Número de pacientes	% Pacientes
CALCIFICACIONES pequeñas no agrupadas, redondas	25	48,6 %
CALCIFICACIONES groseras, distróficas, en pop corn	8	16,2 %
QUISTES GRASOS	4	8,1 %
SUGESTIVAS DE MALIGNIDAD	0	0 %

Figura 63. Tabla resumen de los hallazgos radiológicos obtenidos con la técnica de la mamografía al total de los 52 pacientes al año de evolución.

CAMBIOS RADIOLÓGICOS TEMPRANOS (AL AÑO):

52 PACIENTES

RMN

La resonancia magnética con contraste obtuvo un rendimiento más alto que otras técnicas para los quistes, con una buena diferenciación entre las distintas variedades.

Así, 11 de los pacientes del total de 52 (lo que representa un 21,6 % del total) presentaba quistes lipídicos simples, caracterizados por ser quistes radiolúcidos sin membrana ni cápsula envolvente.

Una cantidad mayor, en 17 pacientes del total de 52 (lo que supone un 32,4%), se observaron quistes lipídicos complejos, que se caracterizan por ser mayores de 1 mm de diámetro. (Figura 64 y 65).

Ninguna de las pacientes presentó patrón de captación sugestivo de malignidad.

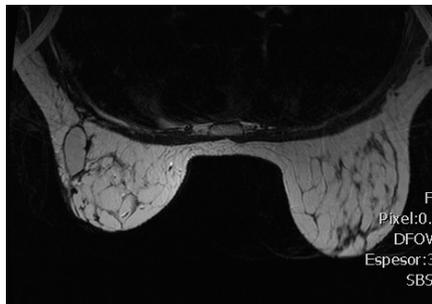


Figura 64. Se aprecia quiste lipídico complejo obtenido al año mediante RMN.

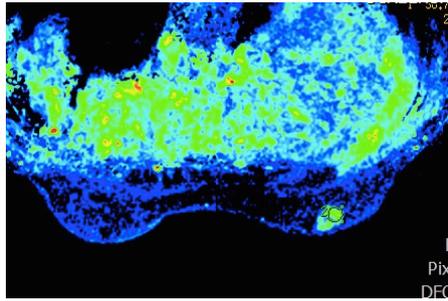


Figura 65. La misma lesión tras la administración de contraste.

ALTERACIÓN RADIOLÓGICA	Número de pacientes	% Pacientes
QUISTES LIPÍDICOS SIMPLES (<10 mm)	11	21,6 %
QUISTES LIPÍDICOS COMPLEJOS = LIPONECROSIS (>10 mm)	17	32,4 %
PATRÓN DE CAPTACIÓN DE MALIGNIDAD	0	0 %

Figura 66. Cuadro resumen de los hallazgos radiológicos obtenidos mediante rmn al año de evolución en el grupo de 52 pacientes.

CAMBIOS RADIOLÓGICOS TARDÍOS (TRAS 3 AÑOS):

33 PACIENTES

MAMOGRAFÍA Y ECOGRAFÍA

ALTERACIÓN RADIOLÓGICA	Número de pacientes	% Pacientes
SIN CAMBIOS	20	61,1 %
AUMENTO DE LESIONES	5	15,3 %
DISMINUCIÓN DE LESIONES	5	15,3 %
NUEVAS LESIONES BENIGNAS	3	7,7 %
NUEVAS LESIONES MALIGNAS	0	0 %

Después del control anual, se intentó un seguimiento a más largo plazo en el que se intentó determinar la estabilidad de las lesiones existentes o la posibilidad de que aparecieran nuevas lesiones.

Se consiguió mantener en revisión a un grupo de 33 pacientes del total de 52.

En ellos no se apreció la aparición de lesiones malignas, que era el objetivo de este estudio.

Se precedió mediante la realización de ECO y mamografía, al control de las lesiones benignas preexistentes y se apreció

que en una mayoría (20 de los 33 pacientes, lo que corresponde a un 61,1% del total), las lesiones eran estables desde el primer año, y no hubo cambios ni en la cantidad de las mismas ni en las características de las ya preexistentes.

En 5 de los pacientes (15,3%) se apreció el aumento de lesiones fundamentalmente calcificaciones que fueron apareciendo y aumentando de número, presentando las mismas características benignas que las ya preexistentes.

En el mismo número de pacientes (5 pacientes que corresponden al 15,3%), se observó una disminución de la cantidad y el tamaño de las lesiones. Fundamentalmente a expensas de los quistes oleosos y lipídicos, observación predecible por los normales mecanismos de reabsorción que forman parte de la vida lógica de ese tipo de lesiones.

Solamente en un grupo muy pequeño, de tres pacientes, se observó la aparición de hallazgos radiológicos que no habían aparecido el primer año, todos ellos calcificaciones distróficas.

2.5.- Análisis de grado de satisfacción.

2.5.1.- Grado de satisfacción estética.

El grado de satisfacción en función de los resultados estéticos tras la cirugía, fue valorado mediante una escala del 0 al 3; siendo 0=No satisfecha, 1=poco satisfecha, 2= satisfecha y 3= muy satisfecha.

Del total de 52 casos, en 49 (94%) de los mismos, los resultados estéticos fueron muy satisfactorios. En 2 casos (3,8%) los resultados fueron satisfactorios. (Figura 67).





Figura 67. Nos muestra la secuencia fotográfica de un caso tras la extirpación del tumor. En él, se procede a cerrar la cavidad bien hermética, lo que produce retracciones en superficie que posteriormente rellenaremos con tejido adiposo, obteniéndose un buen resultado a largo plazo.

Secuencia fotográfica que ilustra el proceso quirúrgico de la técnica diseñada para este procedimiento. Se pueden observar las retracciones a distancia que se producen al extirpar la tumoración y cerrar la cavidad, y cómo el volumen se recupera al infiltrar el injerto graso. En el postoperatorio,

en la región supra areolar de la mama izquierda, se puede apreciar secuelas de la radiodermatitis, no correspondiendo esa lesión a ninguna cicatriz quirúrgica.

En el siguiente caso podemos ver el antes y el después con la pieza extirpada entre ambas fotografías para apreciar el gran volumen de la lesión que se extirpó, lo que demuestra la capacidad regenerativa y reconstructiva de la técnica.



Figura 68. En esta secuencia se observa el ANTES, arriba, de una paciente con una tumoración en mama derecha. En el centro vemos la pieza tumoral extirpada. Y en la última fotografía el resultado tras un año de evolución que demuestra que la colocación de injertos grasos es fiable, efectiva y sobre todo, estable al persistir de forma indefinida en el tiempo.

Un último caso para observar la recuperación del volumen y la simetría con la colocación del injerto a distancia:



ANTES



DESPUÉS

Figura 69. Las flechas de señalización muestran en el ANTES, el lugar donde se han producido las depresiones tras extirpar la tumoración, y el DESPUÉS muestra la capacidad de corrección de esta técnica.

::RESULTADOS



Figura 70. En ella podemos ver nuevamente una secuencia en una paciente que además necesitó resección cutánea. La primera fila de fotografías es el estado preoperatorio. Tras la exéresis se puede ver en la secuencia de en medio las depresiones típicas de esta técnica señalizadas mediante flechas. Posteriormente se aprecia que, tras el relleno, el aspecto de la paciente al cabo de un año es totalmente satisfactorio. No hay asimetría evidente y el resultado se ha mantenido estable por lo que tras un año se puede considerar definitivo.

Solamente en 1 caso (1,9%), los resultados estéticos fueron poco satisfactorios debido a no se consiguió alcanzar un volumen razonable, produciéndose al igual que de no haberse producido el tratamiento, retracción cutánea significativa con desviación de la areola y el pezón hacia la zona de resección tumoral.

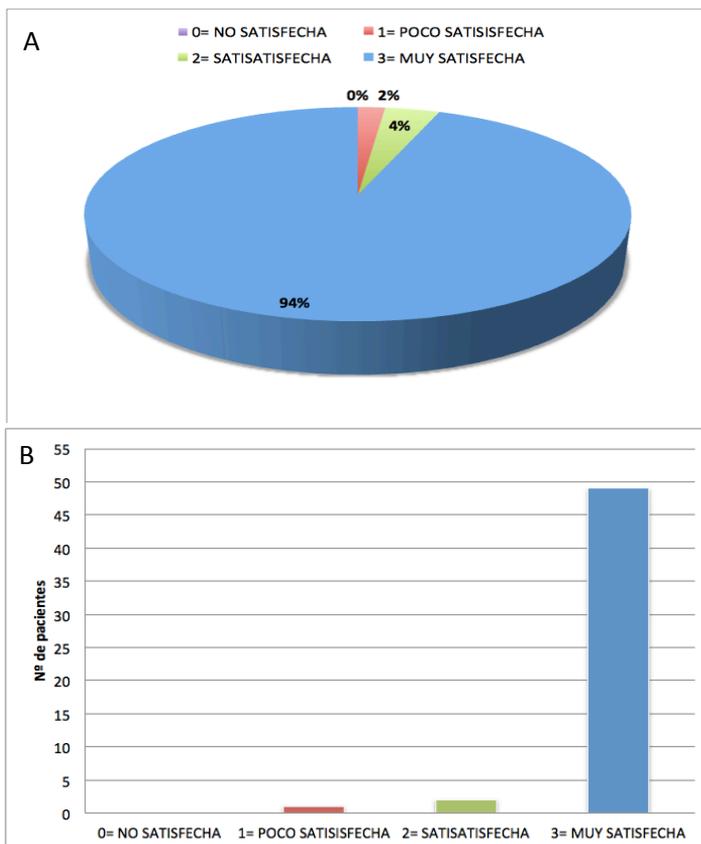


Figura 71. Gráfica de la distribución del total de las pacientes incluidas en el estudio en función del grado de satisfacción estética. A: Porcentaje de pacientes. B: N° de pacientes.

2.5.2.- Grado de satisfacción de las pacientes.

El grado de satisfacción de los resultados quirúrgicos en función de las pacientes, fue valorado mediante una escala del 0 al 3; siendo 0=No satisfecha, 1=poco satisfecha, 2= satisfecha y 3= muy satisfecha.

Del total de 52 casos, 48 (92,3%) pacientes manifestaron estar muy satisfechas con los resultados obtenidos. En 2 casos (3,8%) las pacientes se mostraron satisfechas y solamente en 2 casos (3,8%) las pacientes mostraron poca satisfacción debido a la falta de volumen y asimetría evidente. (Figura 72).

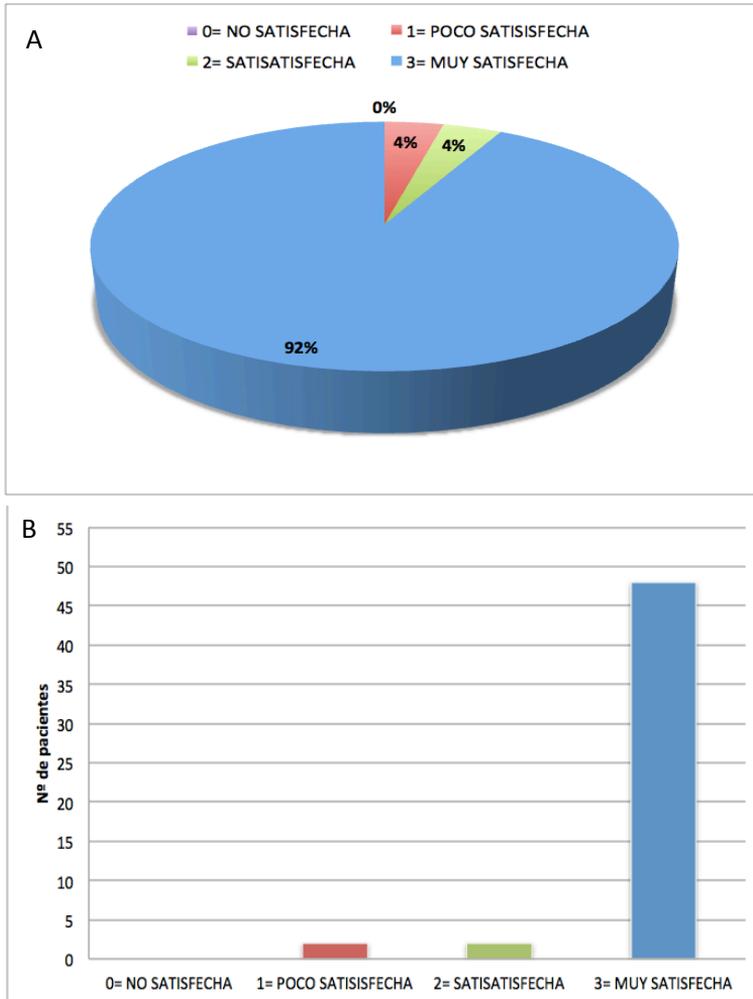


Figura 72. Gráfica de la distribución del total de los casos llevados a cabo en este estudio en función del grado de satisfacción de las pacientes. A: Porcentaje de pacientes. B: Nº de pacientes.

:: DISCUSIÓN

VII. DISCUSIÓN.

1. Discusión trabajo experimental.

Este es el primer estudio en vivo sobre el efecto del tejido adiposo en células con metástasis de cáncer de mama, conducidas por el uso de injertos de grasa humana extraída y manejada del mismo modo, ya que se hace de manera rutinaria en la práctica clínica. (Moltó García R y cols, 2013).

Lo que nos llevó a desarrollar este modelo experimental es la ausencia de estudios en vivo que cumplieran con los procedimientos habituales desarrollados en la práctica clínica. Los estudios relatados hasta ahora están basados en estudios in vitro usando células madre aisladas del tejido adiposo. Muchas de estas células, cuyas características biológicas se diferencian de aquellas de tejido adiposo adulto que usamos en la práctica clínica, segregan factores y mediadores de la inflamación que expresan genes diferentes de aquellos del tejido normal y tienen una capacidad de interacción biológica que no se encuentra en adipocitos normales. (Sommer B y cols, 2012). Esta es la razón por la que la reacción de estas células con cualquier otro tipo de célula (cancerosa o no) será inusual en términos biológicos.

El diseño experimental se llevó a cabo meticulosamente, en términos cuantitativos y cualitativos, debido a la relevancia de las implicaciones clínicas para pacientes con cáncer de

mama, que pueden implicar el uso de injertos de grasa en la reactivación de células cancerosas residuales después de una reconstrucción mamaria. (Halua MH y cols, 2013).

Los recientes avances en el diagnóstico de cáncer de mama nos han permitido que incluyamos técnicas más innovadoras y sensibles como técnicas moleculares que muestran una sensibilidad más alta, y también sensibilidad en cuanto a técnicas clásicas histológicas e inmunohistoquímicas. Fue demostrado que en algunos casos, los genes se regulan pero la proteína no se detecta, debido a los mecanismos de regulación post-transcripcionales. Recientemente, estudios en la corteza ovárica de pacientes con cáncer de mama han apoyado la necesidad del desarrollo de instrumentos diagnósticos mejorados basados en marcadores moleculares específicos de cáncer de mama y técnicas moleculares más sensibles. Por esta razón decidimos complementar la técnica proteómica y los estudios *in vivo* de animales con el uso de SBEM y análisis genómicos. (Novella Maestre y cols, 2010).

SBEM es un nuevo cáncer de mama metastásico de moléculas asociadas cuya expresión de la proteína y el gen se correlacionan con metástasis. Se relata que más del 90% del CDI expresa SBEM, y su expresión tiene que ver con el descubrimiento histopatológico de metástasis en los ganglios linfáticos. Aunque la expresión de SBEM sea independiente del estado del receptor y grado del tumor, se ha observado que esta expresión aumenta un alto grado en tumores de

pecho y tumores con ER negativo que sugieren que SBEM tiene que ver fuertemente con marcadores del pronóstico pobre, y puede ser útil como un marcador independiente para pacientes diagnosticados de cáncer de mama con riesgo de altos grados de metástasis o reaparición. Se ha demostrado que la expresión de SBEM puede servir como un marcador para el descubrimiento de micrometástasis de la médula ósea en pacientes con cáncer de mama y micrometástasis hematológica.

La selección de la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-468, para realizar esto en el estudio en vivo, se debió a que es una línea celular con potencial metastásico alto. Se aisló por primera vez en 1977 de una muestra de la efusión pleural de un paciente con cáncer de pecho que murió a causa de la enfermedad. Presenta un crecimiento extraordinariamente rápido en medios de cultivo de bajo enriquecimiento, en parte por una regulación autocrina de factores de crecimiento celular. (Kil WH y cols, 2014).

En este estudio, consideramos que no es necesario incluir un control adicional en el cual los ratones se inyectaron solo con HAT porque se sabe que el tejido adiposo tiene un potencial de proliferación limitado sin capacidad de migración, un hecho que se demuestra en nuestros resultados de la expresión genética cuando observamos que ninguno de los ratones presentes, en cualquier órgano analizado, la condición SBEM-hHPRT+ que sería indicativa de células del

HAT sin capacidad metastásica, habían migrado de la cápsula renal izquierda a otros órganos. (Taback B y cols, 2001).

Las imágenes obtenidas por el estudio de “Desarrollo Metastásico en vivo” no mostraron diferencias significativas entre los dos grupos de estudios en términos de ubicación de metástasis. Sin embargo, el gen y los estudios de la expresión de la proteína del marcador metastásico SBEM1, nos permitió distinguir los órganos afectados, resultando en menor nivel de afectación del páncreas y riñón derecho de los animales con MDA-MB-468/HAT.

El hecho de que los animales inyectados con el HAT tuvieran una mejor evolución que los demás, no significa que la reconstrucción con grasa autóloga pueda suponer alguna ventaja para el paciente en términos de cáncer, pero el hecho de conducir una reconstrucción mamaria con HAT no supone un riesgo adicional en caso de que las células cancerígenas restantes existan después de una mastectomía.

Además, los resultados de este estudio demuestran que los estudios realizados hasta ahora en esta línea de investigación, están lejos de nuestros procedimientos clínicos. La inoculación y el crecimiento in vitro de células no diferenciadas en medios enriquecidos representa una brecha en el campo de la medicina regeneradora debido a su crecimiento y potencial de diferenciación. Sin embargo, la

reconstrucción mamaria en el campo de la cirugía plástica no intenta procesos regenerativos, simplemente el uso de tejido adiposo como relleno biológico. (Coleman SR. 2006).

Además, los resultados de este estudio demuestran que los estudios realizados hasta ahora en esta línea de investigación, están lejos de nuestros procedimientos clínicos. La inoculación y el crecimiento in vitro de células no diferenciadas en medios enriquecidos representa una brecha en el campo de la medicina regeneradora debido a su crecimiento y potencial de diferenciación. Sin embargo, la reconstrucción mamaria en el campo de la cirugía plástica no intenta procesos regenerativos, simplemente el uso de tejido adiposo como relleno biológico.

2. Discusión del trabajo clínico.

Básicamente una de cada ocho españolas sufrirá un cáncer de mama a lo largo de su vida., lo que unido a la carga socio cultural que la mama implica en nuestra sociedad, hace que su estudio, y tratamientos tengan una amplia repercusión. (Rodríguez-Cuevas S, y cols 2001).

La introducción de nuevas modalidades terapéuticas, como la cirugía conservadora de mama, frente a las antiguas modalidades de mastectomías amplias y mutilantes, han tenido un asentamiento complicado, con grandes detractores en sus inicios (ASPRS. Report on autologous fat

transplantation. Plast Surg Nurs. 1987). No fue hasta la década de los 80 en la que Veronesi (U Veronesiy cols 2002) y sus colaboradores, en un estudio aleatorizado, compararon la mastectomía clásica de Halsted con la técnica QUART (cuadrantectomía, vaciado ganglionar axilar y radioterapia local del pecho operado).

En 1980 finalizó la inclusión de 701 pacientes (lesión tumoral < 2 cm, sin adenopatías axilares palpables) y los resultados publicados no mostraron diferencias en la recurrencia de la enfermedad, en el tiempo libre de enfermedad, o en la supervivencia global y la comunidad científica comenzó a aceptarla e incluirla en las formas validas de tratamiento, lo que supuso que hoy en día la mayoría de los pacientes puedan acogerse a esta modalidad de tratamiento, con las ventajas que esto comporta en cuanto a menor mutilación.

En cirugía mamaria, desde las primeras intervenciones, nos hemos ido adaptando y desarrollando modelos de reconstrucción con: expansores, colgajos, microcirugía, etc. a los distintos retos que se nos iban planteando.

Este abanico de soluciones se vino abajo en cuanto la cirugía oncológica desarrolló e introdujo las técnicas de cirugía conservadora, la cuadrantectomía o la tumorectomía.

¿Por qué supone un gran hándicap la cirugía conservadora para el cirujano plástico?

- **Deja defectos parciales.** Lo que implica que ninguno de los colgajos clásicos nos servirá de forma efectiva ya que las posibilidades de forma del defecto que encontraremos son prácticamente infinitas.

Además, la pequeñez del defecto, que es como máximo $\frac{1}{4}$ de la mama en una cuadrantectomía, o menos en las tumorectomías, hará que la paciente vea desproporcionada la cirugía de reconstrucción de las técnicas clásicas (DIEP o DA).

- **Siempre o casi siempre, va seguida de radioterapia.** Cuando realizamos un plan integral de tratamiento del cáncer de mama, obligatoriamente tendremos que incluir la reconstrucción mamaria. La radioterapia, como veíamos en la introducción, casa mal con algunos tipos de reconstrucción, particularmente aquellas que dejan cuerpos extraños del tipo de las prótesis o los expansores.

Vamos a ver como afectan los problemas a los distintos tipos de reconstrucción que justifique que había que buscar una alternativa que nos permitiese abordar la problemática de las pacientes intervenidas quirúrgicamente mediante cirugía reconstructiva.

2.1. Discusión de las ventajas de la reconstrucción autóloga frente a las prótesis.

En particular es interesante las comparativas entre cirugía reconstructiva autóloga y aquella que empleaba material protésico, como los expansores y las prótesis. Estudiaron seis trabajos publicados que incluían pacientes de ambos grupos, Lipa y sus colaboradores encontraron una tasa significativamente mas alta de complicaciones en el grupo de pacientes con reconstrucción con implantes. No se observaron complicaciones en 23 de 26 reconstrucciones sobre implantes, mientras que hubo 10 complicaciones entre 24 colgajos dorsal ancho (LD) y 12 entre los 34 Colgajos de músculo recto abdominal (TRAM) en el grupo de reconstrucción autóloga. Tres de las complicaciones en el grupo autólogo estaban relacionados con los implantes utilizados para aumentar en estas operaciones. La mayoría de los pacientes con una reconstrucción con implantes, tuvieron complicaciones tempranas, menores que desaparecen espontáneamente, pero la extracción del implante fue necesaria en 11 pacientes durante todo el periodo de seguimiento. (J Roostaeian y cols, 2001) (JE Lipa y cols, 2003).

Las probabilidades de complicaciones del sitio de mama eran un 80% menor en los pacientes sometidos a una reconstrucción LD y 91% menor en los pacientes sometidos a

un procedimiento TRAM que en los pacientes que tenían reconstrucciones sobre implantes.

Giroto también encontró que los pacientes con reconstrucciones de implantes tenían peores resultados en términos de dolor y limitación física papel que aquellos con reconstrucciones autólogas. (Giroto, 2003).

Estos estudios valoraban también la repercusión del tipo de reconstrucción en función del grupo de edad, intentando romper el viejo tópico de que a partir de cierta edad las horas de quirófano y la “mayor” agresividad quirúrgica de las reconstrucciones autólogas las desaconsejarían en estos pacientes mas añosos. Por el contrario encontraron que, de 818 pacientes a los que se les practicó un colgajo de dorsal ancho, había 122 procedimientos que se habían realizado en pacientes de mas de 60 años y encontraban que la tasa de complicaciones había sido similar al resto, y la estancia operatoria también había sido la misma, entre tres y cuatro días de media.

(PG CORDEIRO et al 2011) et al también encontraron resultados similares en un grupo más reducido de 55 pacientes.

Ambos autores llegaban a la conclusión de que las reconstrucciones autológicas, incluso en los grupos en los que la mayor agresividad quirúrgica podía provocar mas complicaciones, eran de elección frente a cirugías mas

simples como las reconstrucciones con implantes, ya que a la larga la mayor cantidad de complicaciones que estas proporcionan las desaconsejan.

2.2. Inconvenientes del uso de colgajos autólogo tipo DIEP y otros para la corrección de defectos parciales.

1) Los tiempos de realización de un DIEP en las mejores manos no baja de cinco horas de quirófano. Requiere de un equipo altamente experimentado, con un mínimo de cuatro cirujanos, dos para la zona donante y dos para la zona receptora. (Mohan, Anita T. Y cols, 2016).

2) Generalmente requiere de ingreso en reanimación /UCI un periodo no menor de un día, lo que lo convierte en una técnica de sitios muy especializados, y aunque en raras ocasiones algún problema específico de estas unidades hemos tenido, como la sobreinfección por bacterias muy poliresistentes propias de esos ambientes. Además, los pacientes reciben mal la noticia de que van a tener que ingresar en una de estas unidades ya que para ellos es sinónimo de gravedad del procedimiento, lo que no deja de ser cierto.

3) La tecnología necesaria es alta: microscopio, instrumental microquirúrgico, suturas muy especiales,

todo ello implica que se trata de procesos médicos muy caros que no están al alcance de todos los pacientes , y en aquellos países en los que la sanidad publica la incluye en su cartera de servicios, genera una demanda y una presión asistencial que dificulta el desarrollo de otras técnicas y la atención de otros pacientes.

4) Por otra parte, las técnicas microquirúrgicas no son técnicas exentas de riesgos. La dificultad de la cirugía provoca un tiempo quirúrgico alto. El acceso a la cavidad pleural para el abordaje de la mamaria interna, que suele ser la receptora habitual, o la disección de los pedículos epigástricos hasta su confluencia prácticamente con la arteria femoral, hace que sea una cirugía con complicaciones.

5) Además, la amplitud de las incisiones, propia de las abdominoplastias, hace que las dehiscencias o necrosis marginales sean vistas con cierta frecuencia. (Wan, Derrick C. Y cols, 2010).

6) La localización de las mejores en el área peri umbilical en un número significativo de los casos, hace que en un número nada despreciable de estos las cicatrices de la abdominoplastia para extraer el colgajo queden exageradamente altas, lo que las hace difícilmente ocultables con la ropa de baño habitual y

el defecto estético ocasionado en el abdomen empequeñece el defecto que hubiera quedado en la mama y que estaríamos tratando de reconstruir. (Feingold, Randall S y cols, 2009).

7) La inervación de los músculos rectos abdominales es segmentaria y proviene de las correspondientes metameras. En la disección del pedículo vascular desde la correspondiente entrada de la perforante seleccionada, se cortan muchas ramas nerviosas que sin llegar a producir los defectos tan evidentes que producía el colgajo TRAM, nos vamos a encontrar muchas debilidades de pared abdominal o “bulkings” que tienen repercusión estética y funcional, pues son áreas de discinesia muscular que actúan como verdaderas hernias. (Fanzio, Paolo Maria, y cols, 2015)

Todo esto unido a que en cirugía conservadora cada vez es mas raro que exista un déficit de piel, hace que las pacientes rechacen sistemáticamente la posibilidad de un colgajo microquirúrgico para el defecto de una cuadrantectomía o resección parcial de la mama.

Como acabamos de ver la realización de los grandes colgajos con técnicas sofisticadas, deberían reservarse a las grandes reconstrucciones en las que es preciso aportar todas las estructuras de la mama, o por lo menos contenido y

continente. (Cañizares Orlando y cols, 2015).

En cuanto a la posibilidad de realizar colgajos locales sin microcirugía la posibilidad es aún mas remota.

En esta categoría encontraríamos el colgajo de dorsal ancho y el colgajo de músculo recto abdominal, conocido como TRAM. En estos colgajos las secuelas de las zonas donantes son mas manifiestas en forma de denervaciones y debilidades de la pared abdominal y verdaderas hernias en el caso de los TRAM.

En el caso del músculo dorsal, la cicatriz que deja es muy visible y provoca un cambio en la arquitectura del pilar posterior del hueco axilar que está formado por el tendón y el inicio del vientre muscular de dicho músculo, y que al girar para transportarlo a la región anterior del tórax, provoca una deformidad en forma de abultamiento.

También los pacientes que son reconstruidos mediante esta técnica muestran debilidad a la aducción y aproximación del brazo a la línea media del cuerpo en su parte posterior. De ahí el nombre en latín, que traducido viene a decir el “aproximador de la mano al ano”. Y en los postoperatorios es muy frecuente que desarrollen seromas, que sin ser una patología grave e invalidante sí que requiere varias visitas y un aumento en los costes de la reconstrucción. En una serie de Munhoz, publicada en 2012 en PRS, refiere una tasa de complicaciones próximas al 36%, presentando un 4% mas de

una complicación. Se observó dehiscencia de la herida en un 20%, seroma en un 12%, pérdida parcial del colgajo en 8% e infección local de la herida en 4%. Estas cifras hacen referencia a técnica reconstructiva sin prótesis asociada, ya que cuando se asocia, que en reconstrucción mamaria es muy frecuente, las complicaciones van a aumentar.

Existen aún otras posibilidades de colgajos locales, mas raras y por lo tanto menos aplicables. En nuestras manos únicamente el TDAP (Toraco Dorsal Arteria Perforante) ha encajado alguna vez en los requisitos que la lesión nos demandaba. En su contra, decir que se trata de un colgajo técnicamente difícil, que requiere un buen entrenamiento en la microdissección ya que aunque pediculado se basa en una perforante arterial de pequeño calibre que surge de el borde anterior del músculo dorsal y permite obtener una pequeña isla cutánea. No suele presentar un buen drenaje venoso y las congestiones venosas son muy frecuentes, aunque una buena parte de ellas se corrige de forma espontánea, sin mas maniobras quirúrgicas.

Existen técnicas de reconstrucción autóloga mas sofisticadas entre ellas por utilidad personal que le hayamos encontrado estaría el SGAP o colgajo de glútea perforante, o el colgajo de perforante de músculo gracilis con isla trasversal. Ambos usados por este autor. Son colgajos buenos, pero requieren de una altísima preparación técnica y un sofisticado instrumental, aparte de un equipo bien entrenado y

conjuntado. Presentan a gusto de este autor dos inconvenientes importantes: el primero, que los colgajos se deben sacar en una posición mientras que su colocación es en otra lo que convierte la cirugía en larga y tediosa al tener que cambiar varias veces al paciente de posición. El segundo hándicap es que dejan cicatrices en zonas no tan ocultas como el DIEP. Las cicatrices del colgajo de gracilis están ubicadas en el pliegue inguinal, pero con frecuencia descienden, aunque poco, pero lo suficiente para que ningún traje de baño pueda ocultarlas. Las cicatrices del SGAP, quedan en la zona superior del glúteo, en una zona visible y de gran tensión cutánea, por lo que es frecuente que al cabo del tiempo se enganchen o hipertrofien. (Van Derric, 2010).

El colgajo IGAP, dependiente de la perforante inferior de la glútea inferior, sigue el pliegue glúteo crural y le ocurre lo mismo que al colgajo de gracilis, que a poco que descienda levemente, por la tipología de la ropa de baño femenina, ya no hay forma de ocultarla.

Además, muchas de estas pacientes luego refieren una dificultad de aceptación por la falta de simetría de estos dos colgajos, ya que de no ser bilaterales, se encuentran con una cicatriz y una forma de la nalga distinta a la contralateral (mejorada pero distinta).

Por último, los colgajos autólogos tienen un problema, y es que a veces fallan. Estos fallos cuando reproducen, asoman

a la paciente a un panorama devastador. (Wilkins, Edwin G. y cols, 2000).

En primer lugar, fallan después de muchas horas de cirugía y normalmente después de algún intento de rescate que ha añadido mas horas de quirófano, transfusiones, y estancias en la sala de UCI o reanimación, y que no han añadido tranquilidad a la familia del paciente.

Después de pasar la incertidumbre de si sobrevive el colgajo, pasarán unos días y habrá que volver a meter a la paciente a desbridar la zona necrótica y cuidar las heridas que se le hayan producido. Durante todo este proceso, las complicaciones normales de una cirugía también pueden aparecer. Una hemorragia postquirúrgica por ejemplo, si al fracaso de un colgajo, y sus reintervenciones en intento de salvamento, añadimos una reintervención para desbridar y se manda a casa a la paciente sin reconstruir, llena de cicatrices y alguna secuela y con no menos de cuatro o cinco pasos por quirófano, en hospitalizaciones casi nunca inferiores a las dos semanas.

Existen muchos trabajos en la literatura científica que cuantifican el impacto devastador de uno de estos procesos y sus repercusiones en los pacientes.

En este estudio evaluaron siete pacientes en los últimos años que sufrieron fallo completo de un colgajo DIEP, estudiando las repercusiones físicas y psicológicas que tuvo el proceso

para ellas y para su vidas familiares y de pareja.

Encontraron un primer componente que era hacer frente a las emociones, que les hacían reconsiderar el acierto de su decisión. Por otro, encontraron sentimiento de discomfort respecto a la propia autoimagen, difíciles de manejar, refiriendo sentimientos y usando palabras al referirse al proceso que habían sufrido como: “desfiguración” y “mutilación”, que son palabras que ningún cirujano ha pensado que oíría nunca refiriéndose a su trabajo.

El estudio reflejaba también la terrible degeneración de la relación del médico-paciente ante la adversidad, daba igual si el comportamiento del cirujano había sido correcto o si la cirugía había transcurrido dentro de los límites de lo razonable.

RECONSTRUCCIÓN MAMARIA MEDIANTE PRÓTESIS Y EXPANSORES.

En el inicio de la exposición ya hemos visto el capítulo que hace referencia a las prótesis. Estas como tal, presentan una serie de inconvenientes, que cuando se consideran por separado son de baja incidencia, cuando se cuantifican todas alcanzan un número nada despreciable.

A modo de ejemplo, el estudio de Henriksen sobre casi mil pacientes a los que se les había implantado prótesis mamarias, encontraba que el 19% en el primer año

presentaban una u otra complicación que obligaba a la revisión. De estas complicaciones, nada menos que el 29% eran complicaciones que obligaban para su corrección mediante nueva intervención quirúrgica. (Seth AK y cols, 2012).

Son un cuerpo extraño: un cuerpo extraño mas o menos bien diseñado pero extraño. Como les digo a mis pacientes de estética, el cuerpo humano no está diseñado para tener cuerpos extraños en su interior, aunque se haya conseguido que sean razonablemente compatibles.

Pero afectan a la contracción muscular que existe sobre ellos, dilatan la piel y atrofian la glándula.

Sólo sirven para reconstrucciones completas: la utilidad con sus inconvenientes que ahora veremos para la reconstrucción mamaria mediante prótesis es mas que una evidencia.

Sin embargo, las prótesis solo sirven para realizar reconstrucciones completas de mama, están pensadas con una base que apoye la pared torácica y una forma que imita la de una mama convencional. En este caso, la problemática nos la proporcionaba que en cirugía conservadora el patrón de resección es absolutamente impredecible y por completo variable. Por lo tanto, casi nunca se adaptaban a la zona que pretendíamos reconstruir, por tamaño o por forma.

Infección: los implantes mamarios presentan una baja tasa de infección, en ocasiones menor del 2%, pero asociada a radioterapia esta tasa se incrementa enormemente. Sobre todo durante los meses que siguen al primer año. (Zeplin, Philip H y cols, 2010).

Extrusión: la tasa de extrusión de los implantes mamarios también esta notablemente incrementada en la combinación de radioterapia, fundamentalmente a partir del primer año. Klaus Ramet le publicaron un estudio en el que intentaban demostrar la utilidad de una plantilla que habían patentado para ayudar a la reconstrucción mamaria inmediata con prótesis. Pero este no es el dato útil de su estudio, el dato útil es que en el grupo control, el que se practicaron reconstrucciones con prótesis, la incidencia de complicaciones que requirieron la reintervención fue del **50%**, de las cuales el **14,7%** acabó en explantación. Hay que tener en cuenta que este estudio no incluía seguimiento a largo plazo, mas allá de seis meses de duración, y que no incluía la contractura capsular como complicación, por lo que de haberlo hecho la tasa sería aún mucho mas elevada. (Cohen Tervaer y cols, 2017).

Necrosis de los colgajos cutáneos tras la exéresis tumoral: Kim Dae Young, en 2016 en PRS, publicaba un estudio comparativo, en el que encontraba que las pacientes que se sometían a mastectomía y se les insertaba un expansor cutáneo tenían hasta el 28% de complicaciones

mayores, de las cuales la mitad casi correspondían a necrosis cutánea del colgajo de cobertura del expansor, lo que constituye una de las complicaciones mas graves que se pueden presentar y que obligatoriamente acabara en el 100% de los casos en exposición protésica, retirada del expansor y por lo tanto fracaso del intento reconstructivo.

Falta de definición del surco submamario: los que hemos practicado durante muchos años reconstrucción mamaria con prótesis, ya sea de forma inmediata o tras la interposición de un expansor, encontramos siempre un defecto en el surco submamario que queda tenso, como levantado, y el polo inferior poco definido. (Fisher L. y cols, 2004). En 2016 publicaba que la reconstrucción basada en expansor de tejido en el pecho irradiado se ha asociado con complicaciones importantes, incluyendo la infección, rotura de la piel y la extrusión del implante, y un mal resultado estético. Estas complicaciones pueden atribuirse a la expansión inadecuada polo inferior que causa aumento de la presión en la línea de sutura.

Para ello, inventó un expansor de doble cámara en el que publicaba una serie en la que “sólo” el 14 % de sus pacientes desarrollaba una complicación, pero al analizar con mas detalle los resultados encontramos que considera la contractura grado uno y dos como “aceptable” y no computan como complicación, además solo hacia la evaluación de sus pacientes hasta el año de la cirugía, con lo que seguramente

esa cifra de contractura severa se dispararía en fechas posteriores ya que es a partir del año cuando la contractura comienza a ser de grado elevado.

Contractura capsular: supone la complicación mas frecuente que podemos encontrar cuando realicemos una reconstrucción con prótesis. Es una complicación relativamente frecuente pero muy difícil de evaluar en su alcance total sospechando los que nos dedicamos a esto que nos pintan un panorama mucho mas benigno que la cruda realidad. (Lipa y cols, 2013).

Además, esta complicación que ya es frecuente en la reconstrucción norma alcanza cifras astronómicas cuando se combina con radioterapia en el mismo paciente. En nuestra casuística durante cinco años en el Hospital La Fe de Valencia hasta el 55% de los pacientes así tratados si se les examina a largo plazo. (Moltó y cols, 2013).

¿Por qué encontramos entonces cifras tan benignas en otros estudios?

La razón de esta discrepancia está en que muchos pacientes no se siguen, están atendido por unidades no especializadas en reconstrucción en las que por lo general no hay ningún cirujano plástico que tenga una adecuada formación en el uso de prótesis mamarias. Se evalúa al paciente a las pocas semanas de la cirugía y si aquello esta razonablemente bien se les da el alta, apareciendo el paciente a los años, que es

la fecha en la que se produce la contractura capsular severa en el hospital porque ya los síntomas dolorosos son demasiado evidentes, estando a paciente incapacitada para tareas tan simples como dormir boca abajo. En esos momentos, se le dice que son cosas del cáncer o se la remite sin más a unidades de cirugía plástica que desconocen al paciente, y que tampoco van a poner demasiado empeño en reconstruir la historia de un paciente que ni conocen ni normalmente aporta ningún interés científico por la simpleza de su caso.

Existe un fenómeno que a nadie se le escapa, en que se mantenga medio camuflado este aspecto de la reconstrucción con prótesis y es que el mundo de las prótesis mamarias es un negocio multimillonario, en la que los intereses comerciales son enormes, por lo tanto hay pocos caminos para dar una verdadera dimensión del problema, y aun así ya las cifras que se presentan son escalofrantes como veíamos en el capítulo de la introducción.

2.3. Discusión sobre la cirugía oncoplástica.

La cirugía reconstructiva oncoplástica se realiza en pacientes seleccionados con cáncer de mama para permitir el tratamiento de conservación cuando se esperaría que la tumorectomía o cuadrantectomía, para tener un resultado estético pobre. Estas técnicas no sólo cambian el tejido de la mama, pero también pueden desplazar la posición de la base

del tumor. La incisión oncoplástica puede no tener ninguna relación con la base del tumor.

Aunque el uso de la radioterapia no presenta mayor inconveniente cuando se trata de irradiar toda la mama, muchas veces el radioterapeuta puede encontrar dificultad para la realización de una sobreimpresión en la base original del tumor, según las modernas pautas del tratamiento radioterápico de la mama según la cirugía conservadora.

Pezner, R. en 2013 realizó el siguiente experimento, marco con clips de titanio las zonas del tumor primario y después comprobó en donde se había administrado la radioterapia, encontrando que de los 11 pacientes estudiados, 8, es decir, nada menos que un 73% de ellos el lecho tumoral se extendía más allá del cuadrante original en algunos casos se ubicaba en otro cuadrante completamente distinto. Es más en las conclusiones del estudio llega a la conclusión de que el lecho del tumor en pacientes con reconstrucción oncoplástica es a menudo grande, de forma irregular, y/o dividirse en 2 o 3 regiones dentro de la mama. No se puede localizar de forma fiable basado en la ubicación de la cicatriz, la ubicación seroma, y/o localización radiográfica o clínica preoperatoria del tumor primario.

La cirugía oncoplástica fue ideada para esas mamas que reunían características que permitían mediante alguna de las técnicas convencionales de reducción mamaria, extirpar el

tumor y reconstruir la mama. Posteriormente, con la difusión de la técnica y su empleo con manos menos experimentadas, se convirtió en la posibilidad de desarrollo de cualquier colgajo que consiga la movilización necesaria de tejido para rellenar un defecto de tumorectomía, lo que la convierte en una cirugía no sistematizada, muy de “autor”, y que convierte en muy arduo el trabajo del radioterapeuta.

El valor del impulso local de RT para reducir la frecuencia de las recidivas locales en la mama se demostró en la Organización Europea para la Investigación y Tratamiento del Cáncer (EORTC). Los pacientes que recibieron RTTC y un impulso locales tuvieron menos recurrencias ipsilaterales de mama en comparación con los pacientes que sólo recibieron RTTC.

Por lo tanto, el valor de este tipo de radioterapia en los pacientes que reciben tratamiento mediante cirugía oncoplástica es incuestionable y cualquier maniobra que la dificulte su correcta aplicación debe hacer pensar sobre la bondad de ese tratamiento.

Sin embargo en muchas series como la de Fitoussi, (http://journals.lww.com/plasreconsurg/Abstract/2010/02000/Oncoplastic_Breast_Surgery_for_Cancer__Analysis_of.4.aspx Alfred 2010) que expone los resultados con 550 pacientes consecutivos, encuentra que es una técnica útil en casos de

tumores grandes, o moderados en senos pequeños, alcanzando según el unas cotas de simetría razonable.

Dejando aparte la seguridad oncológica, que en manos experimentadas y prudentes puede que cumplan criterios de calidad, pero que en caso contrario puede ser una técnica altamente peligrosa si no se adoptan todas las medidas posibles como demostraba Pezner en el análisis de los lechos que se irradiaban en lugares equivocados por haber hecho oncoplástica, encontraríamos que en la oncoplástica, a diferencia de nuestra técnica, el volumen extirpado no se repone. Se cierra la mama redistribuyendo el volumen.

Por lo tanto, si se indica para tumores con una relación tumor/mama alta, aunque se consiga una simetría de forma, de ninguna manera se podrá obtener una simetría de volumen.

2.4. Discusión de la seguridad de los injertos grasos.

DISCUSIÓN SOBRE LA TÉCNICA QUIRÚRGICA.

Cuando se empezó a hablar de reconstrucción mamaria mediante autoinjertos grasos, una de las posibilidades de esta quedó excluida: la reconstrucción mamaria inmediata, ¿por qué?

Halsted, el padre de la mastectomía que aún se emplea, dijo que su uso solo iba a implicar un estorbo en la detección de recidivas o nuevos cánceres, a cambio de ningún beneficio

real ya que los injertos se reabsorberían o quedarían transformados en quistes grasos o convertidos en abscesos.

La propia Sociedad Norteamericana en 1987, proclamaba que eran una practica peligrosa y sinónimo de mala praxis y que debería quedar proscrita para siempre. (ASPRS. Report on autologous fat transplantation. Plast Surg Nurs. 1987).

Sin embargo, como siempre, la práctica clínica ha encontrado el camino para eludir este obstáculo, en varios centros, sobre todo europeos, se iniciaron estudios reglados (y otros no tan reglados) como la presente tesis doctoral en los que se ha podido ir valorando la realidad de las cosas.

1) Interferencia en la detección de recidivas.

2) Interacción celular de los injertos que puedan producir o empeorar un cáncer de mama.

1) Interferencia en la detección de recidivas.

Bajo este epígrafe englobaríamos todas las secuelas que la técnica quirúrgica y la propia biología pueden producir en el receptor de un injerto graso.

Como ya mencionábamos el grupo de nuevos procedimientos de la ASPRS se mostro ampliamente preocupado por la posibilidad de microcalcificaciones y necrosis grasa de la mama que pudieran entorpecer el diagnostico.

Spear (Spear et al 2016) en la mas amplia revisión que se ha realizado, analiza 598 estudios que reúnen las palabras clave y de ellos selecciona 36 que cumplen una serie de criterios en cuanto a la duración de estudio, numero de pacientes y criterios evaluados. Aunque de estos 36 solo 18 incluían información sobre las complicaciones de los ITA.

En estos trabajos se encontraron complicaciones del tipo calcificación, quistes y necrosis grasas, y aun que la mayoría de ellos recogía algún tipo de anomalía física tras el procedimiento, la tasa real fue bastante baja.

En nueve de ellos se informaba sobre la formación de quistes aunque la prevalencia real durante e seguimiento fue solo del 4,5%.

En nuestro estudio estas cifras alcanzaron unos valores mas altos de aproximadamente a 22 pacientes si consideráramos los quistes lipídicos simples menores de 10 mm m, a los que había que sumarles 12 pacientes que presentaban quistes complejos (mayores de 10 mm), que aumentaron al 11% a los pacientes que fueron seguidos en periodos mucho mas largos (37 de ellos a los tres años). También como en otras lesiones los radiólogos observadores concluyeron que no había ninguna lesión que fuese susceptible de ser confundida con una maligna, o sospechosa de malignidad por ella misma.

Spear analiza la prevalencia de la necrosis grasa y la cifra en el 6,7% cifra muy muy inferior a la hallada en nuestro estudio que recoge una incidencia de 12 pacientes lo que implica un porcentaje del 32,4% si lo sumamos a los quistes lipídicos complejos ya que los consideramos una manifestación de la misma causa patogénica.

Al igual que Spear se correlaciono la existencia de mayor esteatonecrosis con aquellos pacientes que habían tenido porcentualmente una mayor inyección de grasa en relación la lesión y al volumen de la mama, aunque estos datos no alcanzaron congruencia para un verdadero análisis estadístico.

El tema de las microcalcificaciones es aun mas confuso, la variación de porcentajes varia de estudios tan bajos como el 3% a valores tan altos como los de nuestra serie que incluyen al 48% de los pacientes a los cuales tras una busca meticulosa se hallo el rastro radiológico del calcio. Hemos de destacar que en la mayoría de los estudios de la serie de Spear no se recogen datos sobre las microcalcificaciones, cosa que llama poderosamente la atención al tratarse de uno de los signos que si pueden confundirse radiológicamente con la presencia de un cáncer.

Tampoco hemos encontrado unos trabajos en los que hagan una descripción del tipo de calcificaciones que encontraron, ya que en nuestro estudio, ninguna reunía los criterios que

reúnen las calcificaciones que avisan de la presencia del tumor. En nuestra serie las calcificaciones fueron todas redondas y aisladas, es decir, no agrupadas. Este fue el grupo mas numeroso hallándose en el 48% de los pacientes, y coexistiendo con ellos o por separado, encontramos calcificaciones groseras, del tipo “macro” o en palomitas de maíz (pop corn). Estas macrocalcificaciones aparecieron en menor medida, ya que solo se mostraron en 16% de los pacientes. (Costantini M, y cols 2013). Todas las series estudiadas coinciden en que no existe en ningún caso patrón que reproduzca las microcalcificaciones del cáncer.

La cantidad de lesiones que en todas las series de nuestro estudio los radiólogos consideraron como sospechosas de malignidad fue de cero.

De la valoración de los hallazgos radiológicos solo habría que preguntarse una cosa, y es la gran discrepancia que existe según analices una serie u otra, y que en el caso de las calcificaciones va del 4 al 48% en nuestra serie. Probablemente los hallazgos que nosotros referenciamos en nuestra serie es porque el radiólogo y el cirujano que analizaron las imágenes tenían instrucciones precisas de buscarlas. Mientras que ese mismo informe realizado por un radiólogo convencional que busca lesiones clásica patológicas, las pasaría por alto ante su irrelevancia clínica.

Esta apreciación serviría tanto para los quistes como para las micro o macrocalcificaciones aisladas.

Otra cuestión que puede influir es la tecnología del desarrollo de los equipos y la calidad intrínseca de los mismos. En este estudio se usaron los equipos mas nuevos y potentes del hospital la Fe, mientras que desconocemos en que ambiente se han realizado los otros estudios.

Esta disparidad de criterios no es única de nuestra serie, existiendo otras en que la cantidad de hallazgos es similar a los que nosotros hemos encontrado.

Con todo independientemente de la cantidad de lesiones de cada tipo hallamos encontrado, lo importante para el estudio es que ninguna de las pacientes presento ninguna lesión que a los radiólogos les pudiera inducir a confusión.

No ocurre lo mismo con la fibrosis post quirúrgica, de la serie de 52 pacientes, dos de ellos presentaron induraciones en las zonas de infiltración, este fenómeno también viene recogido en otros trabajos en un porcentaje similar y al igual que en nuestros casos, a pesar de que la radiología que se le solicito al paciente informaba de lesión de BI_RAD de bajo grado, ante la fase experimental de la técnica se decidió biopsia por aspiración que resulto negativa para celularidad maligna. (Choi M, y cols, 2013).

Estas lesiones fibrosas que pueden inducir a error, no son para nada exclusivas de esta técnica de reconstrucción mamaria inmediata mediante injertos de grasa autóloga. Se ven con cierta frecuencia en DIEP, y otras técnicas de reconstrucción mamaria incluidas las que emplean expansores.

Ni siquiera son exclusivas de las pacientes a las que se someten a una cirugía reconstructiva, ya que también las vemos en otras cirugías mamarias, como la reducción o mastopexia, y que no supusieron un freno para estas técnicas.

Otro gran enigma en la instauración de la técnica era que repercusiones iba a tener la forma de aplicación del injerto grasa en la seguridad del tumor.

En cirugía oncológica hay una serie de reglas que siempre hay que respetar: la distancia de seguridad, las manipulaciones del tumor...

Hemos visto la técnica básica y general de la aplicación del injerto grasa. Se debe usar una técnica “multitúnel” para la colocación en una estructura tridimensional de andamio que maximice el contacto de la zona injertada con la receptora para asegurar la máxima supervivencia del injerto. (Coleman SR y cols, 2009).

En reconstrucción mamaria convencional había un reparo técnico, que es como crear este multitúnel tridimensional sin afectar la zona del tumor previo, con una idea clara, si había quedado algún resto de tumor este podría ser dispersado por la cánula que injerta la grasa en la construcción de esta andamio tridimensional. (Coleman SR, 2009).

Este reparo es mucho mas patente en el caso de la reconstrucción mamaria inmediata, ya que en ella generalmente no se disponen de los márgenes completos de la pieza resecada por lo que el riesgo de que haya quedado algo es mas que alto.

¿Tiene esto algún efecto en la dispersión del tumor? ¿O no es mas que una conjetura?

En la reconstrucción mamaria inmediata no tenemos constancia de cómo otros autores han conseguido evitar que el injerto graso acabe rellenando la cavidad dejada por el tumor extirpado, ya que no viene el detalle de la técnica quirúrgica empleada, solucionan el tema explicando que han rellenado en todos os planos de la mama.

Este es un reparo que nosotros aún no hemos querido vencer porque no estábamos seguros de la inocuidad del tema.

Solo hay una serie que publica un aumento de las recidivas en reconstrucción mamaria mediante autoinjertos grasos, es

la de Petit, el autor en su primer trabajo de mas de 600 pacientes, encuentra que existe un aumento de las recidivas pero solo en un grupo de pacientes, aquellos cuyo diagnostico era el de "carcinoma in situ", si bien es cierto que este hallazgo no se ha repetido en las otras series, es también cierto que no hemos encontrado más series de pacientes que incluyan este diagnostico, de echo en los criterios de exclusión de nuestro propio trabajo están excluidos. (Petit JY y cols, 2011).

Nosotros pensamos que este hallazgo bien se podría explicar debido a que el carcinoma in situ es el que peor delimitación previa a la cirugía tiene el cirujano, pues las pruebas de imagen son menos válidas para este cáncer y se suele extender de forma caprichosa mas allá del núcleo de las calcificaciones que suelen ser el único hallazgo radiológico.

Por lo tanto, podríamos pensar que al igual que es mas frecuente la recidiva en la extirpación del tumor simple, también podemos encontrar que en mayor numero de casos dejamos bordes positivos de forma inadvertida.

Esto explicaría que la tasa de recidivas o de reintervenciones por bordes afectados sea mayor en los in situ, pero no explicaría los resultados de Petit, ya que él realizaba la comparativa entre dos tipos de carcinomas in situ, por lo tanto si que parecía que el injerto graso influenciaba de manera negativa la final de las recidivas.

Nosotros solo encontramos una explicación al suceso, que la cánula en su paso multi repetido por los bordes de la herida provoca una dispersión de células cancerosas/precancerosas que quedaran de forma residual en el borde de la lesión y que la radiación en foco ya no alcanza de pleno al estar lejos del lecho tumoral que es donde se aplica la “sobreimpresión” de radioterapia.

Sobre el valor de la “sobreimpresión” de radiación en los bordes del tumor, lo que los cirujanos denominamos “el lecho” del tumor, no hay ninguna duda hoy en día.

Aunque el propio Petit se desdijo relativamente en un estudio posterior, en el 2013 sobre la posible consecuencia negativa del uso de ITA tras un Ca de mama. Lo cierto es que la duda persistía en el momento en que nosotros iniciamos este estudio, motivo suficiente para no ignorarlo, y de ahí la necesidad de desarrollar una nueva técnica. (Petit JY y cols, 2013).

Algo parecido al reparo de usar los injertos grasos aplicados con la técnica estándar, nos surgió con las técnicas de la cirugía oncoplástica, con esta técnica teníamos un reparo y a nuestro punto de vista un grave inconveniente.

El reparo es el mismo que en el caso anterior, la movilización de tejidos hace que el lecho del tumor ya no ocupe ni siquiera el cuadrante que ocupaba de forma primigenia. Estos colgajos que se tallan para rellenar el hueco del tumor, hacen

que por una parte no tengamos una referencia exacta de la localización del mismo , por lo que en el caso de aparecer bordes de resección afectos, no siempre sabríamos en que lugar exacto hay que hacer la ampliación y si fuéramos honestos en la mayoría de los casos tendríamos que indicar una mastectomía, en una paciente que probablemente no hubiera estado indicada.

Este mismo efecto se observó ante la dificultad a la hora de aplicar radioterapia para sobreimpresión del lecho. Este segundo efecto se ha mitigado en parte con la colocación de clips de titanio, aunque no es raro la vez que se movilizan o no se detectan fácilmente con la radiología, o los encontramos dispersos y no sabemos a ciencia cierta cual es la movilización que han sufrido y por lo tanto el lugar que ocupaban primigeniamente. (Seth AK, y cols 2011).

Este podría ser el reparo que le vemos a la técnica, el inconveniente, es que no repone el volumen extirpado.

La cirugía oncoplástica de la mama redistribuye el volumen para que la mama no pierda en forma, pero invariablemente disminuye de tamaño en la cantidad exacta del tejido que le extirpamos.

¿Cuál es la consecuencia?

Que si el defecto era de cierta magnitud nos obligara a reducir o modificar la mama contralateral ,condenando a la paciente a la cirugía bilateral.

Con la técnica de reconstrucción inmediata mediante autoinjertos grasos, conseguimos devolver en el mismo acto quirúrgico la simetría y la forma correcta, no interviniendo el lado contralateral si no es preciso, cosa que con la cirugía oncoplástica nunca lograremos, independientemente de que consideráramos que oncológicamente es absolutamente correcta.

No parece haber constancia, ni ha habido en nuestro estudio, un índice de complicaciones de otro tipo, distintos a las técnicas quirúrgicas alternativas, así por ejemplo solo encontramos un caso de infección que se resolvió satisfactoriamente con antibióticos IV.

No apareció en nuestra serie ningún caso de sangrado postquirúrgico mas allá de las normales equimosis que presentan estos pacientes.

2) Interacción celular de los injertos que puedan producir o empeorar un cáncer de mama.

Mucho se ha venido a hablar de este apartado. Hay muchas publicaciones al respecto, la mayoría de ellas confusas, con metodologías muy dudosas, no mencionan la cantidad de ratones que usan para sus series, lo que nos hace pensar

que son muy pocos y muestran resultados altamente espectaculares, coincidiendo en una cosa, sus resultados son aterradores.

Casi todos los que hemos encontrado realizan sus estudios usando tres grupos de control, uno de células cancerosas, otro de células de injertos grasos y un tercero un co-cultivo de ambas. Y los resultados en cuanto a “malignidad” si se puede hablar de eso en cuanto a cultivo de citoquinas asociadas a mal pronostico, o expresión de genes negativos es muy llamativo, ya que las células del ITA solo son las que mas genes negativos y citoquinas expresan, mucho mas que las células puramente cancerosas del cultivo. Se podría realizar un resumen humorístico de la situación diciendo que las células del ITA son mucho mas malignas que las malignas de verdad. (Rowan y cols, 2014).

¿Por qué pasa esto?

Pensamos que hay varias explicaciones para estos resultados tan catastróficos, que de ser ciertos en la realidad clínica harían que la evolución de estos pacientes fuera realmente mala.

La primera y fundamental: cuando se usa esto a estudios para desprestigiar los ITA, se olvida explicar que estos estudios en su totalidad (nosotros después de una búsqueda exhaustiva no hemos encontrado aun la excepción a esto) es que están hechos no con tejido adiposo tal cual empleamos

en la práctica clínica, sino con sus fracciones celulares enriquecidas mediante procedimientos artificiales. (Peltoniemi HH y cols. 2013).

Hemos visto en el apartado de las manipulaciones que se realizan a los injertos, que una de las más frecuentes consistía en extraer la fracción estromal vascular o VSF, esta consiste en un grupo de células en las que la mayoría la componen células mesenquimales indiferenciadas, que demuestran que conservan las características de la “multipotencialidad”, es decir son capaces de diferenciarse en varios tipos distintos de células, pero todas dentro de la línea mesenquimal. Estas células son bastante abundantes en la celularidad del ITA o de tejido adiposo en general, pero no alcanzan ni de lejos el uno por ciento de la totalidad de la celularidad del tejido adiposo que se usa en la práctica clínica real.

Por lo tanto, sean cuales sean sus verdaderas interacciones celulares con el resto, los resultados obtenidos en estos estudios estarían multiplicados por más de cien, ya que como insisto, no se trata de la misma celularidad que se usa en la práctica clínica.

Por otra parte, da la sensación de que los ITA de células enriquecidas con células indiferenciadas, solo potencian los marcadores malignos, así vemos en las series de estos estudios que potencian las citoquinas asociadas a factores

negativos, a recidivas, a peor pronóstico, a marcadores negativos, y en realidad lo que potencian estas células es una gran cantidad de factores, pero en los estudios de estas células solo se exploran digamos los que tienen un factor de connotación negativo.

Así, parece que hoy en día las posibilidades curativas de estas células al secretar factores reparadores o moduladores se han demostrado ampliamente, y nos encontramos su efecto beneficioso en la evolución de cicatrices o contracturas capsulares tras implantes mamarios.

No entendemos porque si en la práctica clínica lo que se usa en el 99% de los casos corresponde a células de tejido adiposo sin manipular ni concentrar, la totalidad de los estudios celulares de co-cultivos se hicieron usando únicamente células enriquecidas de forma artificial, inhabilitando según nuestro criterio, la verdadera interacción celular que se podría producir con un tumor y ver que efectos podría producir.

Exactamente lo mismo ocurre cuando se estudia si la presencia de células del tejido adiposo injertadas pueden promover o favorecer la capacidad metastásica de un tumor de mama. Todos los estudios, (aunque son bastante menos abundantes) que encontramos en la literatura correspondían a estudios in vitro realizados con células cancerosas mezcladas con células extraídas del tejido adiposo mediante

manipulación, no con células adiposas tal cual se usan en la clínica. Se podría argumentar que es una forma de hacer mas evidentes los efectos de determinado grupo celular y que por lo tanto podrían ser resultados extrapolables, pero parece ser que la clínica no esta dando mucha validez a este argumento.

Aquí si que encontramos un estudio realizado en las condiciones que equivalen a la realidad, el nuestro.

Por valorar nosotros la realidad de lo que podían influir los injertos grasos en la capacidad de mestastatización de las células cancerígenas junto a injertos grasos en un modelo animal extrapolable, realizamos el experimento que has encontrado descrito y como no esperábamos de otra forma, los resultados fueron completamente negativos. (Moltó, 2017).

Cuando realizamos nuestro experimento encontramos que no solo había menos mestastatización tumoral en los casos que se les había adicionado injerto adiposo, si no que los tumores de estos ratones demostraron un crecimiento menor, con menos signos de necrosis y menos expresión génica de los genes asociados a mal pronostico, aunque es cierto que las diferencias no fueron significativas a favor, quizás por la cantidad de la muestra.

Discusión sobre la evidencia de la seguridad oncológica de la reconstrucción mamaria mediante injertos grasos.

Hemos visto que la potencialidad de reconstrucción de un injerto graso es enorme, lo que lo está convirtiendo cada vez más en la herramienta de elección en la reconstrucción mamaria y el aumento de pecho estético. Sin embargo la seguridad oncológica sigue siendo un tema que nos preocupa y mucho.

Las ciencias básicas en el laboratorio parecen empeñadas en demostrar una potencialidad maligna que las convierten teóricamente en una terapia cuanto menos peligrosa.

Sin embargo, la investigación clínica, la recogida de resultados en tiempo real han fallado una y otra vez en demostrar un aumento de las recurrencias o una peor evolución de los pacientes que tras un cáncer de mama son reconstruidos mediante esta terapia.

En este intento de demostrar que es una terapia peligrosa, hemos ido viendo estudios muy sesgados, que usan altísimas concentraciones de células indiferenciadas, extraídas y concentradas del tejido adiposo mediante técnicas artificiales, en experimentos completamente artefactados, las concentraciones de ASC en estos estudios es significativamente mayor que lo que se ve típicamente en el injerto de grasa estándar. Sabemos que los injertos de grasa tienen típicamente $4,0 \times 10^5 \pm 2,0 \times 10^5$ ASCs por ml de lipoaspirado y $0,7 \times 10^6 \pm 0,1 \times 10^6$ estroma células

vasculares por gramo de tejido adiposo, lo que hace que en realidad no puedan ser extrapolables a ninguna realidad clínica.

También hemos ido viendo la seguridad clínica, hemos evaluado la tasa de infecciones, las imágenes radiológicas, los sangrados y el grado de satisfacción de los pacientes, y hemos visto que ninguno de ellos podría suponer un verdadero inconveniente para su uso, ya que en ningún caso estaban por encima en cuanto a efectos secundarios que las otras cirugías mamarias que realizamos de rutina, como reducciones mamarias u otro tipo de reconstrucciones tras cáncer.

Queda según nuestro punto de vista, ver si por encima de los análisis particulares causa a causa, al final por suma de causas o motivos que se hubieran escapado en el análisis, el injerto graso supone un peligro o no, y la única forma efectiva de averiguarlo, constituiría ver que ha pasado en los estudios, que recogían datos sobre las consecuencias reales de realizar reconstrucciones mamarias con ITA, que como el nuestro se han ido realizando en el mundo.

Charvet, en 2015 realizó sobre el tema la revisión más amplia que existe hasta el momento sacando de la literatura todo lo publicado al respecto. De los más de 300 estudios publicados, aplicó criterios de exclusión para eliminar los duplicados, los carentes de metodología válida, o aquellos

que habían presentado un seguimiento menor de doce meses. El resultado fueron 16 estudios clínicos entre los cuales el previo de esta tesis tiene el honor de estar incluido, halló 15 que no hallaban ninguna desventaja ni peligro en el uso de ITA, y uno que hallaba una diferencia significativa en un tipo muy concreto de tumor, la neoplasia in situ o intraepitelial. (Charvet y cols, 2015).

El estudio referenciado, el de Petit, encontraba que si existía una diferencia significativa en un grupo que analizaba los hallazgos de los pacientes cuyo diagnóstico era el de Carcinoma “in situ” o neoplasia intraepitelial intraductal mamaria.

¿Por qué en nuestra serie se excluyó este tipo de tumor? y, ¿por qué curiosamente Petit encontraba en su serie que eran los únicos que si que presentaban un peor pronóstico o evolución?

El carcinoma in situ es la neoplasia que peor métodos diagnósticos tiene, la mamografía muchas veces no sirve, ya que hay una porción nada desdeñable de CDIS que no calcifica y que por lo tanto nos impedirá encontrar su marca clásica que son las microcalcificaciones. (Rigotti G, y cols 2010).

La RMN no es tan efectiva como en los tumores invasores, La RM mamaria posee una excelente sensibilidad, superior al 95% en el diagnóstico del cáncer invasor, mientras que en la

detección del cáncer in situ es menor, alrededor del 60%-90% (1,5). Los tumores malignos son susceptibles de ser identificados gracias a la angiogénesis tumoral que los caracteriza. Los neovasos anómalos captan el contraste intensamente y en forma precoz, antes que los vasos normales. Así mismo, la RMN se basa en detección de lesiones hipervascularizadas de alto índice metabólico que les permite una buena captación del gadolinio, pero los tumores fibrosos y los carcinomas in situ, presentan un índice metabólico muy bajo, lo que hace que los falsos negativos sean mas altos que en el otro tipo de lesiones. (Camps J. 2014).

El carcinoma in situ, además presenta un patrón de crecimiento detritico por el interior de los galactóforos, que muchas veces se extiende mas allá de los limites que la radiología nos muestra, puesto que la forma mas fiable de la localización de la extensión del tumor lo constituye los acúmulos de microcalcificaciones que podemos observar en las mamografías.

¿Cuál pensamos nosotros que era la consecuencia de esto que nos hizo excluir el tumor de nuestras series? Pues la dificultad de tener bordes limpios en la cirugía.

El ca in situ es el que mayor porcentaje de bordes afectos presenta, dicho de otro modo, es el tumor que mas probablemente queden restos celulares.

¿Por qué es esto tan importante?

Por la técnica que se emplea en los ITA, si se quedan restos celulares se puede producir una dispersión celular maligna por el resto de la mama o introducirla en los linfáticos y promover las metástasis.

Por otro lado, las células que estamos injertando, se ha visto que en los estudios experimentales pueden presentar un papel promotor del cáncer, por lo que, el que queden restos celulares en contacto con el injerto, podría ser potencialmente peligroso al poner las células indiferenciadas en contacto directo con las cancerosas.

Queda claro pues que aunque nosotros viéramos ciertos reparos y por tanto lo excluyéramos de nuestra serie, tampoco parece que la literatura mundial haya refrendado estos resultados en cuanto a una mayor peligrosidad de este tipo de carcinoma, puesto que ningún estudio mas lo recoge.

Para finalizar, resumir que en la práctica clínica los grandes estudios que recogen toda la casuística de injertos grasos usados en reconstrucción mamaria, no se ha podido evidenciar que estos tengan ningún efecto deletéreo para la evolución de la enfermedad cancerosa en los pacientes en los que ha sido empleado. (Charvet y cols 2015).

:: CONCLUSIONES

VIII. CONCLUSIONES.

A) Conclusiones del estudio experimental.

El principal propósito de este estudio fue nuestra necesidad de chequear que la grasa era un material seguro para la reconstrucción mamaria, Estos resultados demuestran que el tejido adiposo no empeora el pronostico o el curso de la enfermedad en relación a la progresión metastásica cuando se usa en las mismas condiciones que se emplea en la practica clínica

- Parece ser que las metástasis han sido mas numerosas y mas “aparatosas” en los ratones que llevaban únicamente células tumorales.
- La percepción visual de las metástasis con tejido adiposo es que formaban tejidos mas solidos, mas estructurados, mas vitales, con menos signos de necrosis, menos afectación de la pared y la cavidad abdominal.
- La supervivencia también fue ligeramente mayor en las ratas que fueron inoculadas con grasa que en las que se inyectó únicamente línea celular tumoral.

Las mediciones cuantitativas de la expresión del gen SBEM1 han sido sistemáticamente mas altas, contraviniendo pues la idea de que las células pluripotenciales de la grasa, usadas

en su contexto natural (Coleman) aumentan la cantidad o la rapidez del proceso metastásico.

Los hallazgos obtenidos en este estudio demuestran que el trasplante de tejido adiposo no afecto al desarrollo de metástasis, ni al crecimiento tumoral en el modelo in vivo de cáncer de mama.

B) Conclusiones del estudio clínico en humanos.

La principal conclusión es que el tejido adiposo cuando se usa en la forma que se ha empleado en este estudio no implica un cambio en el curso de la enfermedad, ya que no implica variaciones en cuanto a las recidivas locales o las metástasis a distancia.

De la misma forma se puede deducir que los resultados validan esta técnica como: sencilla, muy ventajosa económicamente y en cuanto a los tiempos quirúrgicos y morbi mortalidad del paciente, y muy satisfactoria en cuanto a resultados estéticos, llenando un hueco hasta ahora vacío en la cirugía plástica.

Se puede deducir también que las alteraciones radiológicas que produce en el ser vivo el injerto de tejido adiposo en la mama, produce unos cambios radiológicos bastante constantes, bien definidos y que no interfieren en la detección de recidivas o metástasis.

:: BIBLIOGRAFÍA

IX. BIBLIOGRAFÍA.

1. Agha RA, Fowler AJ, Herlin C, et al. Use of autologous fat grafting for breast reconstruction: a systematic review with meta-analysis of oncological outcomes. *J Plast Reconstr Aesthet Surg.* 2015;68:143–161.
2. SAPS and ASPS Issue Joint Position Statement on Stem Cells and Fat Grafting. 2011.
3. American Society of Plastic Surgeons. Fat transfer/fat graft and fat injection: ASPS guiding principles. 2009.
4. ASPRS, report on autologous fat transplantation Ad-Hoc Committee on New Procedures, September 30, 1987. *Plast Surg Nurs.* 1987;7:140–141.
5. Auclair E, Blondeel P, Del Vecchio DA. Composite breast augmentation: soft-tissue planning using implants and fat. *Plast Reconstr Surg.* 2013;132:558–568.
6. Aust L, Devlin B, Foster SJ, et al. Yield of human adipose-derived adult stem cells from liposuction aspirates. *Cytotherapy.* 2004;6:7–14.
7. Bertolini F. Contribution of endothelial precursors of a diposetissue to breast cancer: progression-link with fat graft for reconstructive surgery. *Ann Endocrinol (Paris).* 2013;74:106–107.

8. Bonomi R, Betal D, Rapisarda IF, et al. Role of lipomodelling in improving aesthetic outcomes in patients undergoing immediate and delayed reconstructive breast surgery. *Eur J Surg Oncol.* 2013;39:1039–1045.
9. Brenelli F, Rietjens M, De Lorenzi F, et al. Oncological safety of autologous fat grafting after breast conservative treatment: a prospective evaluation. *Breast J.* 2014;20:159–165.
10. Brzezienski AL, Jarrell JA. Autologous fat grafting to the breast using REVOLVE system to reduce clinical costs. *Ann Plast Surg.* 2015. [Epub ahead of print].
11. Cailleau, R., Olive, M., and Cruciger, Q.V., (1978). Long-term human breast carcinoma cell lines of metastatic origin: preliminary characterization. *In. Vitro.* 14, 911 -915.
12. Caviggioli F, Maione L, Forcellini D, et al. Autologous fat graft in postmastectomy pain syndrome. *Plast Reconstr Surg.* 2011;128:349–352.
13. Caviggioli F, Vinci V, Maione L, et al. Autologous fat grafting in secondary breast reconstruction. *Ann Plast Surg.* 2013;70:119.
14. Caviggioli F, Vinci V, Codolini L. Autologous fat grafting: an innovative solution for the treatment of post-mastectomy pain syndrome. *Breast Cancer.* 2013;20:281–282.

15. Choi M, Small K, Levovitz C, et al. The volumetric analysis of fat graft survival in breast reconstruction. *Plast Reconstr Surg.* 2013;131:185–191.
16. Cigna E, Ribuffo D, Sorvillo V, et al. Secondary lipolysis after breast reconstruction with implants. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2012;16:1729–1734.
17. Claro F Jr, Figueiredo JC, Zampar AG, et al. Applicability and safety of autologous fat for reconstruction of the breast. *Br J Surg.* 2012;99:768–780.
18. Coleman, S.R. Hand rejuvenation with Structural Fat Grafting. *Plast Reconstr Surg.* 2002 Dec; 110(7): 1731-1744.
19. Coleman, S.R. Structural fat grafting: more than permanent filler. *Plast Reconstr Surg.* 2006 Sep 1 Supplement:108S-120S.
20. Colpitts, T.L., Billing, P., Granados, E., Hayden, M., Hodges, S., Roberts, L., Russell, J., Friedman, P., and Stroupe, S., (2002). Identification and immunohistochemical characterization of a mucin-like glycoprotein expressed in early stage breast carcinoma. *Tumour Biol.* 23 , 263-278.
21. Constantine RS, Harrison B, Davis KE, et al. Fat graft viability in the subcutaneous plane versus the local fat pad. *Plast Reconstr Surg Glob Open.* 2014;2:e260.

22. Costantini M, Cipriani A, Belli P, et al. Radiological findings in mammary autologous fat injections: a multi-technique evaluation. *Clin Radiol*. 2013;68:27–33.
23. Cordeiro PG, 2011. http://journals.lww.com/plasreconsurg/Abstract/2006/09150/A_Single_Surgeon_s_12_Year_Experience_with_Tissue.1.aspxPG
24. Crisera CA, Chang EI, Da Lio AL. Immediate free flap reconstruction for advanced-stage breast cancer: is it safe? *Plast Reconstr Surg*. 2011;128:32-41.
25. De Blacam C, Momoh AO, Colakoglu S, et al. Evaluation of clinical outcomes and aesthetic results after autologous fat grafting for contour deformities of the reconstructed breast. *Plast Reconstr Surg*. 2011;128:411e–418e.
26. Del Vecchio DA, Del Vecchio SJ. The graft-to-capacity ratio: volumetric planning in large-volume fat transplantation. *Plast Reconstr Surg*. 2014;133:561–569.
27. Doren EL, Parikh RP, Laronga C, et al. Sequelae of fat grafting postmastectomy: an algorithm for management of fat necrosis. *Eplasty*. 2012;12:e53.
28. El Saghir, N.S., Khalil, M.K., Eid, T., El Kinge, A.R., Charafeddine, M., Geara, F., Seoud, M., Shamseddine, A.I. Trends in epidemiology and management of breast cancer in developing Arab

- countries: a literature and registry analysis. *Int J Surg*. 2007 Aug;5(4):225-33.
29. Eterno V, Zambelli A, Pavesi L, et al. Adipose-derived mesenchymal stem cells (ASCs) may favour breast cancer recurrence via HGF/c-Met signaling. *Oncotarget*. 2014;5:613–633.
30. Eto, H., Kato, H., Suga, H., Aoi, N., Doi, K., Kuno, S., Yoshimura K. The fate of adipocytes after nonvascularized fat grafting: evidence of early death and replacement of adipocytes. *Plast Reconstr Surg*. 2012; 129 (5): 1081-1092.
31. FDA Human Cells, Tissues, and Cellular and Tissue-Based Products (HCT/Ps) from Adipose Tissue: Regulatory Considerations; Draft Guidance. 2014.
32. Fisher B, Anderson S, Bryant J, et al. Twenty-year follow-up of a randomized trial comparing total mastectomy, lumpectomy, and lumpectomy plus irradiation for the treatment of invasive breast cancer. *N Engl J Med*. 2002;347:1233–1241.
33. Gabriel A, Champaneria MC, Patrick Maxwell G. Fat grafting and breast reconstruction: tips for ensuring predictability. *Gland Surg*. 2015;4(3):232–243.
34. Gehmert S, Gehmert S, Prantl L, et al. Breast cancer cells attract the migration of adipose tissue-derived stem cells via the PDGF-BB/PDGFR-beta signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun*.

2010;398:601–605.

35. Genes-to-Systems Breast Cancer Database, 2013. <http://www.itb.cnr.it/breastcancer/>.
36. Gentile P, Di Pasquali C, Bocchini I, et al. Breast reconstruction with autologous fat graft mixed with platelet-rich plasma. *Surg Innov.* 2013;20:370–376.
37. Gir P, Brown SA, Oni G, et al. Fat grafting: evidence-based review on autologous fat harvesting, processing, reinjection, and storage. *Plast Reconstr Surg.* 2012;130:249–258.
38. Giroto JA, Schreiber J - *Annals of plastic surgery*, 2003 - journals.lww.com.
39. 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;124:272–280.
40. Haloua MH, Krekel NMA, Winters HA, et al. A systematic review of oncoplastic breast-conserving surgery: current weaknesses and future prospects. *Ann Surg.* 2013;257:609–62.
41. Ho Quoc C, Delay E. [How to treat fat necrosis after liposuction into the breast?]. *Ann Chir Plast Esthet.* 2015;60:179–183.
42. Ho Quoc C, Fakiha M, Meruta A, et al. Breast liposuction: a new treatment of Becker nevus syndrome. *Ann Chir Plast Esthet.* 2015;60:336–339.

43. Hoekman EJ, Smit VT, Fleming TP, Louwe LA, Fleuren GJ, Hilders CG. Searching for metastases in ovarian tissue before autotransplantation: A tailor-made approach. *FertilSteril* 2015;103(2):469-77.
44. Hoppe DL, Ueberreiter K, Surlemont Y, et al. Breast reconstruction de novo by water-jet assisted autologous fat grafting—a retrospective study. *Ger Med Sci.* 2013;11:Doc17.
45. Huang CJ, Hou MF, Lin SD, et al. Comparison of local recurrence and distant metastases between breast cancer patients after postmastectomy radiotherapy with and without immediate TRAM flap reconstruction. *Plast Reconstr Surg.* 2006;118:1079–86.
46. Ihrai T, Georgiou C, Machiavello JC, et al. Autologous fat grafting and breast cancer recurrences: retrospective analysis of a series of 100 procedures in 64 patients. *J Plast Surg Hand Surg.* 2013;47:273–275.
47. Kamakura T, Ito K. Autologous cell-enriched fat grafting for breast augmentation. *Aesthetic Plast Surg.* 2011;35:1022–1030.
48. Kamat P, Schweizer R, Kaenel P, Salemi S, Calcagni M, Giovanoli P, Gorantla VS, Eberli D, Andres AC, Plock JA. Human Adipose-Derived Mesenchymal Stromal Cells May Promote Breast Cancer Progression and Metastatic Spread. *PlastReconstr Surg.* 2015 Jul;136(1):76-84.

49. Kanich DG, Byrd JR. How to increase efficiency in the operating room. *Surg Clin North Am.* 1996;76:161–173.
50. Ke CC, Liu RS, Suetsugu A, et al. In vivo fluorescence imaging reveals the promotion of mammary tumorigenesis by mesenchymal stromal cells. *PLoS One.* 2013;8:e69658.
51. Kerbel RS. A Decade of Experience in Developing Preclinical Models of Advanced- or Early-Stage Spontaneous Metastasis to Study Antiangiogenic Drugs, Metronomic Chemotherapy, and the Tumor Microenvironment. *Cancer J.* 2015 Jul-Aug;21(4):274–83.
52. Khouri RK, Eisenmann-Klein M, Cardoso E, et al. Brava and autologous fat transfer is a safe and effective breast augmentation alternative: results of a 6-year, 81-patient, prospective multicenter study. *Plast Reconstr Surg.* 2012;129:1173–1187.
53. Khouri RK, Khouri RK Jr, Rigotti G, et al. Aesthetic applications of Brava-assisted megavolume fat grafting to the breasts: a 9-year, 476-patient, multicenter experience. *Plast Reconstr Surg.* 2014;133:796–807; discussion 808-799.

54. Kreunin P, Yoo C, Urquidi V, Lubman DM, Goodison S. Proteomic profiling identifies breast tumor

- metastasis-associated factors in an isogenic model. *Proteomics* 2007;7(2):299-312.
55. Kroll SS, Schusterman MA, Tadjalli HE, et al. Risk of recurrence after treatment of early breast cancer with skin-sparing mastectomy. *Ann Surg Oncol.* 1997;4: 193–197.
56. Kuenen-Boumeester V, Den Bakker M, Dinjens WN, Seynaeve C. A metastasis of an adenocarcinoma in a BRCA1 mutation carrier, a diagnostic problem not solved by morphology alone. *Hum Pathol* 2004;35(5):629-32.
57. Kuhbier JW, Bucan V, Reimers K, et al. Observed changes in the morphology and phenotype of breast cancer cells in direct co-culture with adipose-derived stem cells. *Plast Reconstr Surg.* 2014;134:414–423.
58. Largo RD, Tchang LA, Mele V, et al. Efficacy, safety and complications of autologous fat grafting to healthy breast tissue: a systematic review. *J Plast Reconstr Aesthet Surg.* 2014;67:437–448.
59. Leopardi D, Thavaneswaran P, Mutimer KL, et al. Autologous fat transfer for breast augmentation: a systematic review. *ANZ J Surg.* 2014;84:225–230.

60. Lipa JE, AA Youssef, Kuerer HM, Robb GL - and reconstructive, 2003. Breast reconstruction in older women: advantages of autogenous tissue.
61. Liu L, Liu Z, Qu S, et al. Small breast epithelial mucin tumor tissue expression is associated with increased risk of recurrence and death in triple-negative breast cancer patients. *Diagn Pathol* 2013;8:71,1596-8-71.
62. Liu, Z.Z., Xie, X.D., Qu, S.X., Zheng, Z.D., and Wang, Y.K., (2010). Small breast epithelial mucin (SBEM) has the potential to be a marker for predicting hematogenous micrometastasis and response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Clin. Exp. Metastasis* 27 , 251 -259.
63. Losken A, Pinell XA, Sikoro K, et al. Autologous fat grafting in secondary breast reconstruction. *Ann Plast Surg*. 2011;66:518–522.
64. Losken A, Pinell-White X, Hodges M, et al. Evaluating outcomes after correction of the breast conservation therapy deformity. *Ann Plast Surg*. 2015;74:S209–S213.
65. Luyckx V, Durant JF, Camboni A, et al. Is transplantation of cryopreserved ovarian tissue from patients with advanced-stage breast cancer safe? A pilot study. *J Assist Reprod Genet* 2013;30(10):1289-99.

66. Malangoni MA. Assessing operating room efficiency and parallel processing. *Ann Surg.* 2006;243:15–16.
67. Miksicek, R.J., Myal, Y., Watson, P.H., Walker, C., Murphy, L.C., and Leygue, E.,(2002). Identification of a novel breast- and salivary gland-specific, mucinlike gene strongly expressed in normal and tumor human mammary epithelium. *Cancer Res.* 62, 2736-2740.
68. Moltó García R, González Alonso V, Villaverde Doménech ME. Fat grafting in immediate breast reconstruction. Avoiding breast sequelae. *Breast Cancer.* 2014.
69. Moltó García R, González Alonso V, Villaverde Doménech ME. Fat grafting in immediate breast reconstruction. Avoiding breast sequelae. *Breast Cancer.* 2016 Jan;23(1):134-40.
70. Novella-Maestre E, Carda C, Ruiz-Sauri A, Garcia-Velasco JA, Simon C, Pellicer A. Identification and quantification of dopamine receptor 2 in human eutopic and ectopic endometrium: a novel molecular target for endometriosis therapy. *BiolReprod.* 2010;83:866-73.
71. O'Brien, N., O'Donovan, N., Foley, D., Hill, A.D., McDermott, E., O'Higgins, N., and Duffy, M.J., (2007). Use of a panel of novel genes for differentiating breast cancer from non-breast tissues. *Tumour Biol.* 28 , 312-317.

72. Oedayrajsingh-Varma MJ, van Ham SM, Knippenberg M, et al. Adipose tissue- derived mesenchymal stem cell yield and growth characteristics are affected by the tissue-harvesting procedure. *Cytotherapy*. 2006;8:166–177.
73. Orecchioni S, Gregato G, Martin-Padura I, et al. Complementary populations of human adipose CD34+ progenitor cells promote growth, angiogenesis, and metastasis of breast cancer. *Cancer Res*. 2013;73:5880–5891.
74. Paolini G, Amoroso M, Longo B, et al. Simplified liposuction: a technical note. *Aesthetic Plast Surg*. 2014;38:78–82. Peltoniemi HH, Salmi A, Miettinen S, et al. Stem cell enrichment does not warrant a higher graft survival in liposuction of the breast: a prospective comparative study. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. 2013;66:1494–1503.
75. Pérez-Cano R, Vranckx JJ, Lasso JM, et al. Prospective trial of adipose-derived regenerative cell (ADRC)-enriched fat grafting for partial mastectomy defects: the RESTORE-2 trial. *Eur J Surg Oncol*. 2012;38:382–389.
76. Pestana IA, Campbell DC, Barthi G, et al. Factors affecting complications in radiated breast reconstruction. *Ann Plast Surg*. 2013;70:542–5.

77. Petit JY, Botteri E, Lohsiriwat V, et al. Locoregional recurrence risk after lipofilling in breast cancer patients. *Ann Oncol.* 2012;23:582–588.
78. Petit JY, Gentilini O, Rotmensz N, et al. Oncological results of immediate breast reconstruction: long term follow-up of a large series at a single institution. *Breast Cancer Res Treat.* 2008;112:545–549.
79. Petit JY, Lohsiriwat V, Clough KB, et al. The oncologic outcome and immediate surgical complications of lipofilling in breast cancer patients: a multicenter study—Milan-Paris-Lyon experience of 646 lipofilling procedures. *Plast Reconstr Surg.* 2011;128:341–346.
80. Petit JY, Rietjens M, Botteri E, et al. Evaluation of fat grafting safety in patients with intraepithelial neoplasia: a matched-cohort study. *Ann Oncol.* 2013;24:1479–1484.
81. Pu LL, Coleman SR, Cui X, Ferguson RE Jr, Vasconez HC. Autologous fat grafts harvested and refined by the Coleman technique: a comparative study. *Plast Reconstr Surg.* 2008 Sep;122(3):932-7.
82. Quoc CH, Delaporte T, Meruta A, et al. Breast asymmetry and pectus excavatum improvement with fat grafting. *Aesthet Surg J.* 2013;33(6):822–829.
83. Quoc CH, Sinna R, Gourari A, et al. Percutaneous fasciotomies and fat grafting. *Aesthet Surg J.* 2013;33(7):995–1001.

84. Rietjens M, De Lorenzi F, Rossetto F, et al. Safety of fat grafting in secondary breast reconstruction after cancer. *J Plast Reconstr Aesthet Surg.* 2011;64:477–483.
85. Rietjens M, De Lorenzi F, Rossetto F, et al. Safety of fat grafting in secondary breast reconstruction after cancer. *J Plast Reconstr Aesthet Surg.* 2011;64:477–483.
86. Riggio E, Bordoni D, Nava MB. Oncologic surveillance of breast cancer patients after liposuction. *Aesthetic Plast Surg.* 2013;37:728–735.
87. Rigotti G, Marchi A, Stringhini P, et al. Determining the oncologic risk of autologous lipoaspirate grafting for post-mastectomy breast reconstruction. *Aesthetic Plast Surg.* 2010;34:475–480.
88. Rodríguez-Cuevas S1, Macías CG, Franceschi D, Labastida S. Breast carcinoma presents a decade earlier in Mexican women than in women in the United States or European countries. *Cancer.* 2001 Feb 15;91(4):863-8.
89. Roostaeian J, Pavone L, Da Lio A, Lipa J - Plastic and reconstructive surgery, 2011 - journals.lww.com.
90. Rosing JH, Wong G, Wong MS, et al. Autologous fat grafting for primary breast augmentation: a systematic review. *Aesthetic Plast Surg.* 2011;35:882–890.

91. Rowan BG, Gimble JM, Sheng M, et al. Human adipose tissue-derived stromal/ stem cells promote migration and early metastasis of triple negative breast cancer xenografts. *PLoS One*. 2014;9:e89595.
92. Saint-Cyr M, Rojas K, Colohan S, et al. The role of fat grafting in reconstructive and cosmetic breast surgery: a review of the literature. *J Reconstr Microsurg*. 2012;28:99–110.
93. Salgarello M, Visconti G, Rusciani A. Breast fat grafting with platelet-rich plasma: a comparative clinical study and current state of the art. *Plast Reconstr Surg*. 2011;127:2176–2185.
94. Salgarello M, Visconti G, Barone-Adesi L. Fat grafting and breast reconstruction with implant: another option for irradiated breast cancer patients. *Plast Reconstr Surg*. 2012;129:317–329.
95. Sarfati I, Ihrai T, Duvernay A, et al. Autologous fat grafting to the postmastectomy irradiated chest wall prior to breast implant reconstruction: a series of 68 patients. *Ann Chir Plast Esthet*. 2013;58:35–40.
96. Sarfati I, Ihrai T, Kaufman G, et al. Adipose-tissue grafting to the post-mastectomy irradiated chest wall: preparing the ground for implant reconstruction. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. 2011;64:1161–1166.

97. Semprini G, Cattin F, Zanin C, et al. About locoregional recurrence risk after lipofilling in breast cancer patients: our experience. *Minerva Chir.* 2014; 69:91–96.
98. Serra-Renom JM, Muñoz-Olmo J, Serra-Mestre JM. Treatment of grade 3 tuberous breasts with Puckett's technique (modified) and fat grafting to correct the constricting ring. *Aesthetic Plast Surg.* 2011;35:773–781.
99. Serra-Renom JM, Serra-Mestre JM. Periorbital rejuvenation to improve the negative vector with blepharoplasty and fat grafting in the malar area. *Ophthal Plast Reconstr Surg.* 2011;27:442–446.
100. Seth AK, Hirsch EM, Kim JY, et al. Long-term outcomes following fat grafting in prosthetic breast reconstruction: a comparative analysis. *Plast Reconstr Surg.* 2012;130:984–990.
101. Sinna R, Delay E, Garson S, et al. Breast fat grafting (lipomodelling) after extended latissimus dorsi ap breast reconstruction: a preliminary report of 200 consecutive cases. *J Plast Reconstr Aesthet Surg.* 2010;63:1769–1777.
102. Slavin SA, Love SM, Goldwyn RM. Recurrent breast cancer following immediate reconstruction with myocutaneous flaps. *Plast Reconstr Surg.* 1994;93:1191–1204; discussion 1205–1197.

103. Small K, Choi M, Petruolo O, et al. Is there an ideal donor site of fat for secondary breast reconstruction? *Aesthet Surg J.* 2014;34:545–550.
104. Schultz I, Lindegren A, Wickman M. Improved shape and consistency after liposuction of the breast: patients' evaluation of the outcome. *J Plast Surg Hand Surg.* 2012;46:85–90.
105. Seth AK, Hirsch EM, Kim JY, et al. Long-term outcomes following fat grafting in prosthetic breast reconstruction: a comparative analysis. *Plast Reconstr Surg.* 2012;130:984–990.
106. Skliris, G.P., Hube, F., Gheorghiu, I., Mutawe, M.M., Penner, C., Watson, P.H., Murphy, L.C., Leygue, E., and Myal, Y., (2008). Expression of small breast epithelial mucin (SBEM) protein in tissue microarrays (TMAs) of primary invasive breast cancers. *Histopathology* 52, 355-369.
107. Sommer, B., Sattler, G. Current Concepts of Fat Graft Survival: Histology of Aspirated Adipose Tissue and Review of the Literature. *Dermatol Surg.* 26(12): December 2000:1159-1166.
108. Spear SL, Onyewu C. Staged breast reconstruction with saline-filled implants in the irradiated breast: recent trends and therapeutic implications. *Plast Reconstr Surg.* 2000;105:930–42.

109. Spear SL, Pittman T. A prospective study on lipoaugmentation of the breast. *Aesthet Surg J*. 2014;34:400–408.
110. Strong AL, Bowles AC, MacCrimmon CP, et al. Adipose stromal cells repair pressure ulcers in both young and elderly mice: potential role of adipogenesis in skin repair. *Stem Cells Transl Med*. 2015;4:632–642.
111. Strong AL, Cederna PS, Rubin JP, et al. The current state of fat grafting: a review of harvesting, processing, and injection techniques. *Plast Reconstr Surg*. 2015;136:897–912.
112. Sturtz LA, Deyarmin B, van Laar R, et al. Gene expression differences in adipose tissue associated with breast tumorigenesis. *Adipocyte*. 2014;3:107–114.
113. Taback B, Chan AD, Kuo CT, et al. Detection of occult metastatic breast cancer cells in blood by a multimolecular marker assay: Correlation with clinical stage of disease. *Cancer Res* 2001;61(24):8845-50.
114. Tan Q, Tian C, Chen J, et al. Autologous fat grafting for breast reconstruction. *The Cochrane Library*. 2013.
115. Trojahn Kølle SF, Oliveri RS, Glovinski PV, et al. Importance of mesenchymal stem cells in autologous fat grafting: a systematic review of existing studies. *J Plast Surg Hand Surg*. 2012;46:59–68.

116. Valladares-Ayerbes, M., Iglesias-Diaz, P., Diaz-Prado, S., Ayude, D., Medina, V., Haz, M., Reboredo, M., Antolin, S., Calvo, L., and Anton-Aparicio, L.M., (2009). Diagnostic accuracy of small breast epithelial mucin mRNA as a marker for bone marrow micrometastasis in breast cancer: a pilot study. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 135 , 1185-1195.
117. Veber M, Tourasse C, Toussoun G, et al. Radiographic findings after breast augmentation by autologous fat transfer. *Plast Reconstr Surg.* 2011;127:1289–1299.
118. Veronesi U, Cascinelli N, Mariani L, 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;347:1227–1232.
119. Waljee JF, Hu ES, Ubel PA, et al. Effect of esthetic outcome after breast-conserving surgery on psychosocial functioning and quality of life. *J Clin Oncol.* 2008;26:3331–7.
120. Weichman KE, Broer PN, Tanna N, et al. The role of autologous fat grafting in secondary microsurgical breast reconstruction. *Ann Plast Surg.* 2013;71:24–30.
121. Wilkins, Edwin G. *Plastic & Reconstructive Surgery*: October 2000.

122. Wright JG, Roche A, Khoury AE. Improving on-time surgical starts in an operating room. *Can J Surg.* 2010;53:167–170.
123. Yoshimura K, Sato K, Aoi N, et al. Cell-assisted lipotransfer for cosmetic breast augmentation: supportive use of adipose-derived stem/stromal cells. *Aesthetic Plast Surg.* 2008;32:48–55; discussion 56–47.
124. Yoshimura K, Shigeura T, Matsumoto D, et al. Characterization of freshly isolated and cultured cells derived from the fatty and fluid portions of liposuction aspirates. *J Cell Physiol.* 2006;208:64–76.
125. Zimmerlin L, Donnenberg AD, Rubin JP, et al. Regenerative therapy and cancer: in vitro and in vivo studies of the interaction between adipose-derived stem cells and breast cancer cells from clinical isolates. *Tissue Eng Part A.* 2011;17:93–106.
126. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng.* 2001;7:211–228.