

DAMIÁN GARCÍA OLMO. Cátedra UAM-CELLERIX de Terapia Celular y Medicina Regenerativa. Unidad de Terapia Celular del Hospital Universitario La Paz de Madrid

Suelo pélvico. Células madre aplicadas a la incontinencia urinaria

RESUMEN

El término de célula madre se ha hecho tan popular dentro y fuera del foro científico que, en ocasiones, puede parecer que pierde credibilidad. Por esto es tan importante respetar las normas del rigor científico, por un lado y filtrar la información que nos llega, por otro, de manera que nuestra investigación parta de una base completamente revisada.

En este artículo se ha realizado una actualización de la literatura con dos objetivos: conocer cada uno de los tipos de células madre existentes y las ventajas e inconvenientes que presentan; saber cuál es la aplicación clínica en humanos que tienen este tipo de células, basándonos en la revisión de los ensayos clínicos en fase I y II publicados en la literatura.

Palabras clave: células madre, suelo pélvico, incontinencia urinaria, terapia regenerativa.

SUMMARY

The word has been made so popular inside and out of the scientist forum that, sometimes, it can seem that it loses credibility. For this reason, it is so important to respect the scientific rigor rules. On the one hand, we have to filter the information that we receive, on the other hand, so that our research sets off of a completely revised base.

In this article, an update of the literature about it has been carried out with two goals: knowing each of the types of existing and the advantages and disadvantages that they have; knowing which is the clinical application in human beings that have this type of cells, taking into account the revision of the clinical tests in phase I and II that have been published.

Keywords: pelvic floor, urinary incontinence, regenerative therapy.

INTRODUCCIÓN

El término célula madre o célula troncal (*stem cell*) se utiliza para definir una célula indiferenciada con capacidad de autorregeneración que, a su vez, puede dar lugar a diferentes líneas de células especializadas. Es decir, son células con capacidad de división asimétrica (**Fig. 1**). Se describieron inicialmente en el embrión y son el origen de todas las líneas celulares somáticas y germinales que conformarán el nuevo organismo (células madre embrionarias totipotenciales); desde el año 2001 se están describiendo células con características semejantes en diferentes tejidos del organismo adulto (células madre adultas) (Silvester et al., 2004).

Se conoce como terapia celular al método que intenta curar enfermedades con el uso de células vivas. El concepto de medicina regenerativa sugiere la posibilidad de obtener en el laboratorio, a partir de las células madre, órganos con todas sus funciones. Sin embargo, existen todavía barreras importantes en este campo; algunas de ellas son puramente técnicas o de laboratorio (desarrollo de mejores procedimientos de selección y cultivo de células) y otras son las barreras que podríamos llamar fisiopatológicas o médicas (como la posibilidad de inmunotolerancia de las células. Salvar este problema de inmunotolerancia supondría poder realizar trasplantes celulares alogénicos sin necesidad de inmunosupresión).

En este artículo se intentará contestar a dos preguntas que resultan fundamentales para evaluar en qué momento se encuentra actualmente la terapia regenerativa:

- ¿Qué tipo de células madre son mejores para el uso terapéutico en humanos?
- ¿Cuáles son los últimos avances en terapia regenerativa en humanos?

¿QUÉ TIPO DE CÉLULAS MADRE SON MEJORES PARA EL USO TERAPÉUTICO EN HUMANOS?

Las células madre embrionarias se obtienen a partir de un blastocisto. Una vez aisladas de la masa celular interna del embrión en este estadio pueden mantenerse en cultivo de forma indiferenciada porque se dividen indefinidamente. Teóricamente podrían constituir una fuente de progenitores de células de las tres capas embrionarias: endodermo, ectodermo y mesodermo (células pluripotenciales). Sin embargo, no pueden ser usadas en clínica al menos por cuatro graves problemas: son cancerígenas, generan problemas de histocompatibilidad, requieren un gasto imposible de asumir para las patologías que se pretenden tratar y plantean problemas éticos de gran complejidad.

Las células madre adultas se encuentran en tejidos órgano-específicos después del nacimiento. Al principio se pensó que las células progenitoras existentes en los tejidos adultos esta-

ban predeterminadas para generar exclusivamente un tipo de célula especializada de ese tejido. Por ello se las llamó células multipotenciales. Así, por ejemplo, las células progenitoras de las criptas intestinales sólo podrían formar células del epitelio intestinal. Sin embargo, en sucesivos experimentos se ha comprobado que hay células madre en tejidos adultos con capacidad de transdiferenciación, es decir, que son capaces de dar lugar a múltiples líneas celulares de las tres capas embrionarias. De esta manera, estas células podrían ser consideradas verdaderas células pluripotenciales. Un buen ejemplo de ello es que a partir de células madre de la médula ósea se han obtenido líneas celulares como condrocitos, miocitos o neuronas (Conrad et al., 2005).

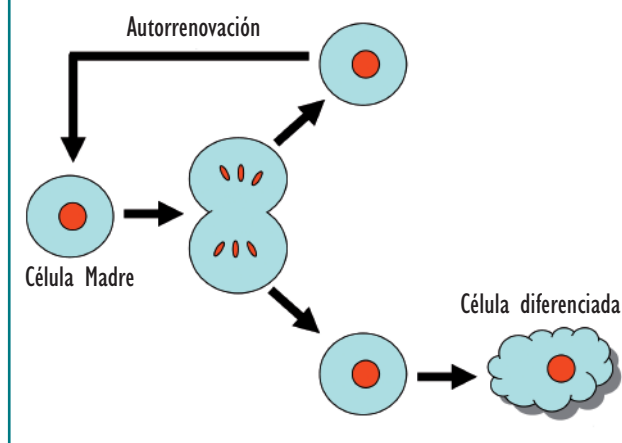
El uso de células autólogas (del mismo sujeto) o alogénicas (de la misma especie) obtenidas de sujetos adultos parece suponer un camino más sencillo y seguro para la terapia celular. Por ello hay que señalar que hoy por hoy el uso de las células madre de origen embrionario está alejado de la clínica humana, por lo que la única fuente celular en la medicina regenerativa actual son los tejidos del propio ser humano adulto. Actualmente hay cinco fuentes de células madre de uso clínico: la médula ósea, la sangre periférica, el cordón umbilical, la biopsia muscular y la grasa (lipoaspirados). La siguiente cuestión es averiguar cuál es el mejor tejido donante.

La capacidad de algunas células del estroma de la **médula ósea** para diferenciarse también en otras líneas celulares no hematopoyéticas está hoy bien documentada. Ha sido demostrado por varios autores (Pittenger et al., 1999) que estas células pueden diferenciarse in vitro evolucionando a osteoblastos, condrocitos o adipocitos en función de los factores de crecimiento que se utilicen para estimularlas. También es interesante la posibilidad de que estas células tras entrar en la circulación puedan migrar a otros lugares del cuerpo donde pueden diferenciarse y reparar tejido dañado. Puede que en el futuro el tratamiento consista únicamente en usar citocinas para incrementar la salida a la circulación de las células madre de la médula ósea, tal y como han mostrado resultados prometedores en modelos murinos (Orlic et al., 2003).

Por otro lado, no debe olvidarse que el uso de citocinas como factores estimulantes de colonias se ha visto asociado a efectos secundarios que aún hoy son difíciles de predecir. El problema es que para obtener poblaciones celulares de la médula ósea es necesario realizar varias punciones bajo anestesia que comportan molestias y riesgos.

Desde 1980 ha sido posible movilizar estas células a la **sangre periférica** donde pueden ser recogidas por aféresis, un procedimiento que es más práctico, menos doloroso y asociado a menor riesgo que las punciones (Lewis et al., 2005). Por otro lado, se ha comunicado que las células madre procedentes de sangre periférica desarrollan el injerto de neutrófilos y plaquetas más rápidamente, reduciendo el riesgo de infección o hemorragia en el tratamiento de la enfermedad hemato-oncológica.

Figura 1. Representación esquemática del concepto de reproducción asimétrica que caracteriza a las células madre.



El trasplante de células de **cordón umbilical** en adultos presenta las siguientes ventajas respecto a las derivadas de médula ósea (Chao et al., 2004): 1. Fácil disponibilidad (se pueden tener en depósito perfectamente testadas y con la tipificación de HLA para su uso inmediato). 2. No existe riesgo para madres y donantes. 3. Posibilidad escasa de transmitir infecciones, particularmente citomegalovirus. 4. Pocas posibilidades de desarrollar enfermedad de injerto contra huésped. 5. Criterios menos estrictos para el cruce de HLA. 6. El donante no sufre una agresión. Este tratamiento se ha utilizado sobre todo en enfermedades hematológicas como leucemia mieloide crónica, leucemia aguda o síndromes mielodisplásicos. El trasplante de células madre del cordón umbilical expandidas ex vivo está todavía en experimentación.

El crecimiento y la regeneración del **músculo** tras una agresión del mismo denotan la existencia de células musculares progenitoras en este órgano (Jankowski et al., 2004). Se ha defendido la idea de que la miogénesis es atribuible a precursores musculares circulantes, habiéndose demostrado en algunos trabajos que esta labor la realizan células madre dependientes del músculo y también de la médula ósea. Esta vía sistémica todavía se encuentra en investigación, ya que no se ha logrado evitar las pérdidas celulares para conseguir que las células cumplan su objetivo. En cualquier caso, la biopsia muscular se ha mostrado como una buena fuente de células madre (Herrerros et al., 2003).

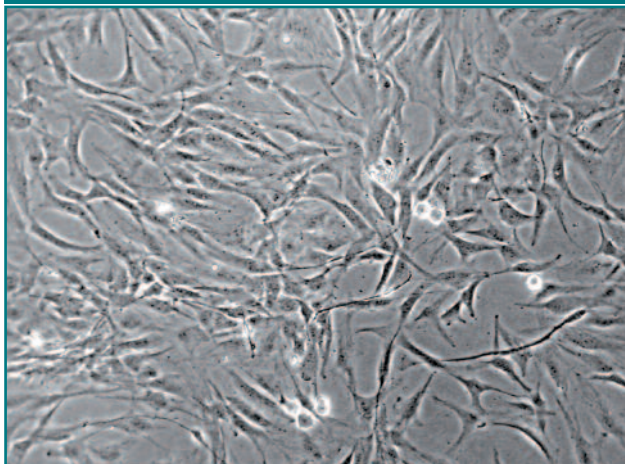
El **tejido adiposo**, como la MO, deriva de la hoja embrionaria mesodérmica y contiene estroma que puede ser aislado fácilmente. Aquí se han identificado células madre denominadas células madre derivadas de lipoaspirado (CMDL) (Zuk et al., 2001 y 2002). El proceso de aislamiento de esta población de células madre fue descrito por primera vez por Rodbell en 1964. Más tarde el procedimiento fue mejorado por varios grupos de investigación y, finalmente, las células fueron caracterizadas como células madre por el equipo de

Hedrick del Laboratorio de Bioingeniería y Reparación Regenerativa del Servicio de Cirugía de la Universidad de California de Los Ángeles (Zuk et al., 2001).

Estas células, al igual que las células madre mesenquimales de la MO, pueden evolucionar hacia líneas osteogénicas, adipogénicas, miogénicas y condrogénicas. Lo más sorprendente es que también pueden diferenciarse en células de características neuronales (Ashjian et al., 2003). Muestran una caracterización muy similar a las derivadas de MO (CD29, CD44, CD71, CD90, CD13, CD105, SH-3 y STRO-1), pero también algunos marcadores específicos (CD49d, CD106, CD54, CD34) (De Ugarte et al., 2003). No se han observado diferencias significativas entre los dos tipos de células respecto a la adherencia estromal, el crecimiento, la senescencia celular, la capacidad de diferenciarse en diferentes líneas celulares y la eficiencia en la transducción genética (De Ugarte et al., 2003). El proceso de obtención se inicia con una liposucción al paciente que se realiza bajo anestesia local o sedación. El lipoaspirado se somete a un proceso de laboratorio mediante el cual se aíslan las células adecuadas; éstas se cultivan a 37° C hasta que el crecimiento alcanza la subconfluencia (**Fig. 2**). En ese momento pueden emplearse terapéuticamente o ser criopreservadas para su uso posterior. Este método presenta las siguientes ventajas respecto al necesario para obtener células de médula ósea: 1. Es seguro. 2. La grasa es un tejido de fácil acceso. 3. Es menos molesto y agresivo que las punciones medulares. 4. Puede realizarse bajo anestesia local. 5. Las células pueden criopreservarse (Mizuno et al., 2003).

Por todo esto, desde nuestro punto de vista de clínicos, las células madre derivadas de lipoaspirado superan incluso a las de médula ósea a la hora de utilizarlas en terapia humana. Como cirujanos, el método de obtención nos resulta sencillo y cotidiano, pero puede ser igualmente alcanzable para cualquier especialista que cuente con un cirujano plástico o general en su centro de trabajo.

Figura 2. Células mesenquimales procedentes de lipoaspirados en cultivo



Al revisar la literatura actual sobre las células madre derivadas de lipoaspirado, se observa que la mayoría de los trabajos publicados se centran en su caracterización en el laboratorio o en ensayos realizados en animales. De hecho sólo se ha comunicado un ensayo clínico realizado en humanos (García Olmo et al., 2005). Esto significa que, a pesar de su manejabilidad y fácil obtención, el clínico todavía no se ha acostumbrado a este tipo de células, posiblemente por desconocimiento o rutina.

Ahora bien, este modelo celular se está analizando ampliamente en modelos experimentales. Se han comunicado estudios en animales que utilizan CMDL como vehículo de determinados genes. Dragoo y cols. (Dragoo et al., 2003, 2005) aislaron células madre derivadas de lipoaspirado de la grasa subcutánea y de la almohadilla infrapatelar y las cultivan en un medio osteogénico. La mitad de estas células fueron transfectadas con un adenovirus con el cDNA para la proteína morfogenética básica (BMP-2). Las células, inmersas en una matriz de colágeno I, fueron inyectadas en una pata trasera de ratones inmunodeficientes; la otra pata fue inyectada con CMDL no modificadas genéticamente. Tras 6 semanas se comprobó que en la pata donde se inyectaron las células transfectadas el hueso tenía una mineralización adecuada y comenzaba a establecer la cavidad medular.

Por otro lado, Martínez-Estrada y cols. (Martínez-Estrada et al., 2005) consiguieron diferenciar CMDL en EPC (células progenitoras endoteliales posnatales) cultivándolas en un medio hematopoyético. El primer marcador que expresaron fue Flk-1, y progresivamente Ve-caderina y factor de Von Willebrand. Dado que el bajo número de EPC en la circulación limita su uso en medicina, las CMDL pueden ser un gran apoyo.

Además, es muy prometedor el efecto antiinflamatorio que presentan las CMDL. Se ha comparado (Puissant y cols., 2005) el efecto de las células madre derivadas de médula ósea con las CMDL. Las CMDL no provocaron in vitro «alorreactividad» frente a linfocitos incompatibles, es más, lograron suprimir la reacción linfocitaria mixta (MLR) y la proliferación linfocitaria como respuesta a mitógenos. Cuando las CMDL y los linfocitos fueron separados por una membrana permeable estos hallazgos no se repitieron, lo que hace pensar que es necesario el contacto celular para desencadenar esta reacción. Aquí surge una nueva idea respecto a la posibilidad de utilizar estas células de manera alogénica a partir de un banco de donantes.

En esta línea, otro estudio (Aust et al., 2004) investigó el rendimiento celular por milímetro cúbico de lipoaspirado y los marcadores de superficie que determinan su fenotipo. Se recogió el producto de lipoaspirado de 18 donantes mujeres, registrando su edad e índice de masa corporal (BMI). El rendimiento celular medio fue de 404.000 ± 206.000 células por milímetro de lipoaspirado, de manera inversamente proporcional al BMI, pero no a la edad. Las CMDL eran positivas homogéneamente para CD10, CD13, CD29, CD44, CD49e, CD59, CD90 y HLA-ABC; y homogéneamente negativas para CD11b, CD45 y HLA-DR. La ausencia del marcador panhematopoyético CD45 indica que las células no derivaban de

células madre circulantes. El hecho de obtener una población tan homogénea procedente de múltiples donantes refuerza también la idea del empleo alógeno en un futuro.

Por último, Morizono y cols. (Morizono et al., 2003) examinaron la infección de las CMDL con vectores como adenovirus, oncorretrovirus y lentivirus, demostrando la posibilidad de transfectarlas con lentivirus. Las células mantienen la expresión transgénica tras diferenciarse en líneas adipogénicas y osteogénicas. Así, las CMDL y un vector como el lentivirus pueden ser una buena combinación como vehículo de la terapia génica.

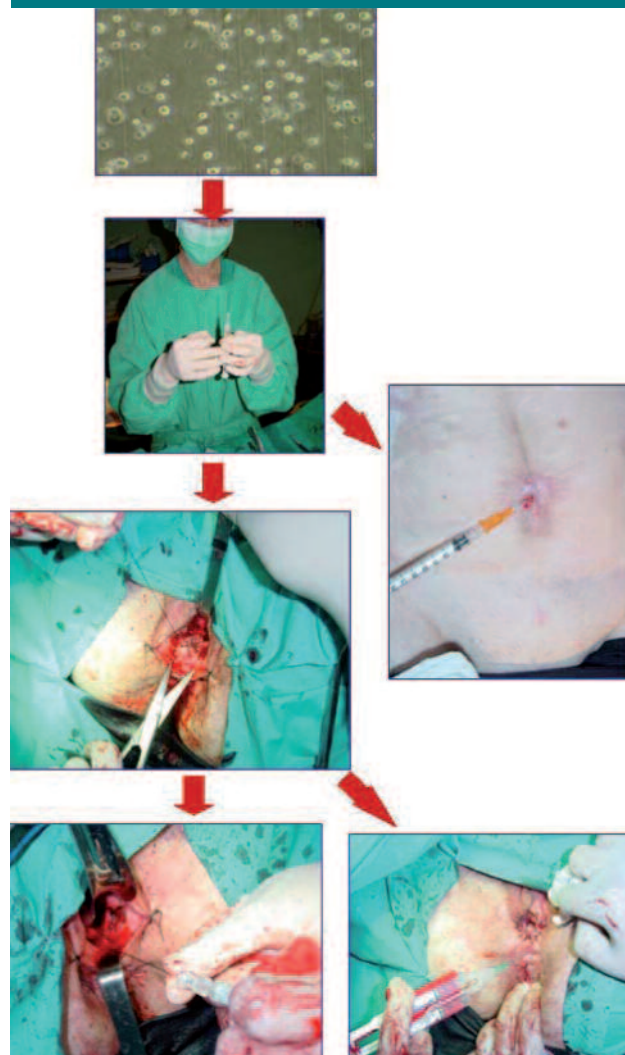
Para utilizar las células en humanos se han desarrollado ensayos de bioseguridad. Para llegar a realizar estudios en humanos las células se han sometido a estudios de caracterización por inmunofluorescencia y de crecimiento. Existe un trabajo en la literatura en el cual se ha comunicado que, tras mantenerlas en cultivos durante mucho tiempo, las CMDL pueden experimentar una transformación neoplásica capaz de desarrollar tumores en el ratón (Rubio et al., 2005). La posibilidad de transformación neoplásica de CMDL humanas in vitro se vio en cultivos en los que se permitió el crecimiento más allá de la subconfluencia, manteniéndolos incluso más de dos meses después del aislamiento celular. En estas células se demostró la transformación neoplásica mediante el estudio del cariotipo, que confirmó la existencia de cambios en el DNA. Se observó, además, que eran células de crecimiento anómalo o no controlado, capaces de desarrollar tumores al inocularse en ratones inmunodeprimidos. Por otro lado, de manera paralela, se cultivaron CMDL evitando el crecimiento más allá del 85% de confluencia celular. En estas células también se estudió el cariotipo y se inocularon después en ratones deficientes, observándose ausencia de alteraciones en el DNA y de desarrollo de tumores en los animales. Esta es la razón por la cual nuestro grupo siempre ha utilizado células del pase 3 o menor, antes de que las células lleguen a la subconfluencia. No hemos observado ningún caso de reacciones de rechazo ni transformación tumoral. Por otro lado, la terapia con células madre derivadas de lipoaspirado, que nuestro grupo utiliza en el tratamiento de fístulas en humanos, se ha demostrado tan segura que ha sido aprobada por la Agencia Europea del Medicamento (EMA) para que este «producto» sea considerado un medicamento huérfano («orphan drug»). Además, este ensayo clínico está registrado en Clinicaltrials.gov, ID: NCT00115466) para el tratamiento de la fístula perianal compleja.

¿CUÁLES SON LOS ÚLTIMOS AVANCES EN TERAPIA REGENERATIVA EN HUMANOS?

El uso de células madre como terapia en humanos se está extendiendo rápidamente en distintos campos de la Medicina. Los grupos que investigaban las enfermedades hematológicas fueron pioneros al iniciar este camino.

Actualmente, los oncólogos trabajan en íntima colaboración

Figura 3. Procedimiento para el tratamiento de las fístulas en el ensayo clínico en fase I



con los hematólogos para tratar enfermedades proliferativas con stem cells. Se ha comunicado un estudio en fase I/II sobre el tratamiento del cáncer de ovario (Frickhofen et al., 2006). Este tipo de tumor es quimiosensible, pero la mayoría de los pacientes mueren por la progresión del mismo. La quimioterapia cura el 25% de los pacientes, por ello está justificado el tratamiento con altas dosis. Se incluyeron 48 pacientes con cáncer de ovario intratable realizándose una movilización de células de sangre periférica con ciclofosfamida y paclitaxel.

Posteriormente las pacientes se sometieron a dos ciclos de altas dosis de quimioterapia con carboplatino/paclitaxel y carboplatino/melfalan/etoposido. A los 8 años, la supervivencia libre de enfermedad fue de 13,3 meses y la supervivencia global de 37 meses. La imposibilidad de regeneración de los miocardiocitos en la enfermedad isquémica supone el fallo cardíaco congestivo posinfarto y el deterioro de la función del ventrículo izquierdo. Tras demostrar que las células madre procedentes de la médula ósea y de la sangre periférica son capaces

de evolucionar a miocardiocitos bajo las condiciones adecuadas, se están utilizando como terapia de la cardiopatía isquémica dentro de varios ensayos clínicos (Schachinger et al., 2006; Bardoff et al., 2006; Emanuelli et al., 2005; y Thorin-Trescases et al., 2005). Este tratamiento parece reemplazar a los miocardiocitos, desarrollar neoangiogénesis y conseguir la remodelación de la cicatriz. También se ha comparado el efecto de stem cells derivadas de médula ósea frente a las derivadas de sangre periférica, asociándose a las primeras una mejora significativa de la eyección del ventrículo izquierdo a los tres meses (Assmus et al., 2006).

Las grandes heridas de los quemados se presentan como otro ejemplo de terapia celular. Gracias a células madre procedentes de la médula ósea se ha conseguido una recuperación precoz tanto de las áreas quemadas como de las zonas donde se extrajeron los autoinjertos libres de piel (Rasulov et al., 2005).

Se ha comunicado el tratamiento satisfactorio de úlceras del limbo ocular en pacientes diabéticos. Tras realizar una inyección en el limbo ocular de células madre derivadas de sangre periférica en los pacientes del grupo de tratamiento se encontró una tasa de cicatrización completa del 77,8% frente a un 38,9% de los pacientes tratados con placebo (Huang et al., 2005).

En casos severos de enfermedades autoinmunes se están utilizando ciclos de altas dosis de quimioterapia seguidos de trasplante de células hematopoyéticas. Los estudios en fase I y II realizados en 473 pacientes mostraron una mortalidad del 11% debido a una complicación del trasplante o a la progresión de la enfermedad. El 71% de los pacientes respondieron a la terapia con una franca mejoría de la enfermedad (Gratwohl et al., 2005).

Una de las líneas de investigación de nuestro equipo es el tratamiento de fistulas en humano con células madre derivadas de lipoaspirado. Hemos desarrollado un estudio en fase I, con el objetivo de demostrar que la terapia es segura y factible, y un estudio en fase II para conocer la eficacia.

Los resultados del estudio en fase I ya han sido comunicados (García-Olmo et al., 2005). Se reclutaron cinco pacientes desde abril del 2002 a noviembre del 2003, tres hombres y dos mujeres. Se realizaron nueve implantes celulares, 4 en fistulas rectovaginales, 4 en fistulas enterocutáneas (tres fistulas en el mismo paciente) y uno en una fistula perianal supraesfinteriana. El seguimiento mínimo exigido en el protocolo fue de 8 semanas. Finalmente se inocularon con CMDL pase 3 o menor nueve fistulas de cuatro pacientes.

Ocho de las fistulas fueron consideradas como evaluables y fueron seguidas durante un mínimo de ocho semanas (tabla 1). Se logró ausencia de supuración y el cierre del orificio externo con reepitelización a la octava semana en seis fistulas (75,0%); estos pacientes se consideraron curados. Las otras dos fistulas sólo mostraron un cierre parcial del orificio externo con disminución del flujo, según refirieron los pacientes, pero con ausencia de reepitelización. Estos dos pacientes fueron considerados no curados (25,0%).

Actualmente se han cumplido más de dos años de seguimiento en todos estos pacientes y ninguno de los considerados curados ha presentado una recidiva de la fistula. No existió relación entre el número de células inyectadas y la reepitelización. No existió relación entre el sexo y la edad de los pacientes y la curación.

Los procedimientos quirúrgicos y de implantación se realizaron de manera habitual y sin dificultades técnicas añadidas debidas a la inyección celular de las nueve fistulas tratadas (Fig. 3). No se observaron efectos adversos en ninguno de los 9 implantes. No se han observado efectos adversos a largo plazo ni aparición de tumores u otras enfermedades en los dos años siguientes a la aplicación de las células (Tabla 1).

Tabla 1. Resumen de los resultados clínicos en la fase I

Nº implante	Nº paciente	Tipo de fistula	Nº pase	Días cultivo	Nº células (x10 ⁶)	Resultado
1	001	Rectovaginal	1	6	6.1	Curado
2	002	Enterocutánea	1	9	9.0	Curado
3	002	Enterocutánea	1	7	8.0	NA
NI	003	Perineal	1	NE	NI	NA
4	002	Rectovaginal	2	14	10.0	No curado
5	002	Enterocutánea	2	8	3.5	Curado
6	001	Rectovaginal	1	12	20.0	Curado
7	004	Enterocutánea	2	16	30.0	No Curado
8	005	Perineal	2	31	20.0	Curado
9	002	Enterocutánea	3	12	15.0	Curado

Por otro lado, hemos concluido el ensayo clínico en fase II que analiza la eficacia de la terapia con células madre derivadas de lipoaspirado para el tratamiento de fistulas perianales complejas que está pendiente de publicación.

Para concluir, ha quedado claro que el tratamiento con células madre adultas es una de las líneas de investigación más prometedoras actualmente.

Lo más importante es la gran aplicación clínica que posee, que esperamos que siga desarrollándose a este ritmo casi vertiginoso, aunque siempre dentro de las normas de buena praxis clínica y siguiendo el máximo rigor científico. ▼

BIBLIOGRAFÍA

Ashjian, P. H.; Elbarbary, A. S.; Edmonds, B.; DeUgarte, D.; Zhu, M.; Zuk, P. A.; Lorenz, H. P.; Benhaim, P.; and Hedrick, M. H. «In vitro differentiation of human processed lipoaspirate cells into early neural progenitors». *Plast Reconstr Surg*, 111(6): 1922-31(2003).

- Assmus B, Honold J, Schachinger V, et al. Transcoronary transplantation of progenitor cells after myocardial infarction. *N Engl J Med*; 355(12):1222-32 (2006).
- Aust, L.; Devlin, B.; Foster, S. J.; Halvorsen, Y. D.; Hicok, K.; du Laney, T.; Sen, A.; Willingmyre, G. D.; and Gimble, J. M. Yield of human adipose-derived adult stem cells from liposuction aspirates. *Cytotherapy*, 6 (1): 7-14 (2004).
- Badorff, C., and Dimmeler, S. Neovascularization and cardiac repair by bone marrow-derived stem cells. *Handb Exp Pharmacol*, (174): 283-98 (2006).
- Chao, N. J.; Emerson, S. G.; and Weinberg, K. I. Stem cell transplantation (cord blood transplants). *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)*: 354-71 (2004).
- Conrad, C., and Huss, R. Adult stem cell lines in regenerative medicine and reconstructive surgery. *J Surg Res*, 124(2): 201-8 (2005).
- De Ugarte, D. A.; Alfonso, Z.; Zuk, P. A.; Elbarbary, A.; Zhu, M.; Ashjian, P.; Benhaim, P.; Hedrick, M. H.; and Fraser, J. K. Differential expression of stem cell mobilization-associated molecules on multi-lineage cells from adipose tissue and bone marrow. *Immunol Lett*, 89 (2-3): 267-70 (2003).
- De Ugarte, D. A. et al. Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow. *Cells Tissues Organs*, 174 (3): 101-9 (2003).
- Dragoo, J. L.; Choi, J. Y.; Lieberman, J. R.; Huang, J.; Zuk, P. A.; Zhang, J.; Hedrick, M. H.; and Benhaim, P. Bone induction by BMP-2 transduced stem cells derived from human fat. *J Orthop Res*, 21(4): 622-9 (2003)
- Dragoo, J. L.; Lieberman, J. R.; Lee, R. S.; Deugarte, D. A.; Lee, Y.; Zuk, P. A.; Hedrick, M. H.; and Benhaim, P. Tissue-engineered bone from BMP-2-transduced stem cells derived from human fat. *Plast Reconstr Surg*, 115 (6): 1665-73 (2005).
- Emanueli, C.; Lako, M.; Stojkovic, M.; and Madeddu, P. In search of the best candidate for regeneration of ischemic tissues: are embryonic/fetal stem cells more advantageous than adult counterparts? *Thromb Haemost*, 94 (4): 738-49 (2005).
- Frickhofen N, Berdel WE, Opri F, et al. Phase I/II trial of multicycle high-dose chemotherapy with peripheral blood stem cell support for treatment of advanced ovarian cancer. *Bone Marrow Transplant*; 38 (7):493-9 (2006).
- Garcia-Olmo, D.; Garcia-Arranz, M.; Herrerros, D.; Pascual, I.; Peiro, C.; and Rodriguez-Montes, J. A. A phase I clinical trial of the treatment of Crohn's fistula by adipose mesenchymal stem cell transplantation. *Dis Colon Rectum*, 48 (7): 1416-23 (2005).
- Gratwohl A, Passweg J, Bocelli-Tyndall C, et al. Autologous hematopoietic stem cell transplantation for autoimmune diseases. *Bone Marrow Transplant*; 35 (9):869-79 (2005).
- Herrerros, J. et al. Autologous intramyocardial injection of cultured skeletal muscle-derived stem cells in patients with non-acute myocardial infarction. *Eur Heart J*, 24 (22): 2012-20 (2003).
- Huang P, Li S, Han M, Xiao Z, Yang R, Han ZC. Autologous transplantation of granulocyte colony-stimulating factor-mobilized peripheral blood mononuclear cells improves critical limb ischemia in diabetes. *Diabetes Care*; 28 (9):2155-60 (2005).
- Jankowski, R. J., and Huard, J. Myogenic cellular transplantation and regeneration: sorting through progenitor heterogeneity. *Panminerva Med*, 46 (1): 81-91 (2004).
- Lewis, A. Autologous stem cells derived from the peripheral blood compared to standard bone marrow transplant; time to engraftment: a systematic review. *Int J Nurs Stud*, 42 (5): 589-96 (2005).
- Martinez-Estrada, O. M.; Munoz-Santos, Y.; Julve, J.; Reina, M.; and Vilaro, S. Human adipose tissue as a source of Flk-1+ cells: new method of differentiation and expansion. *Cardiovasc Res*, 65 (2): 328-33 (2005).
- Mizuno, H., and Hyakusoku, H. Mesengenic potential and future clinical perspective of human processed lipoaspirate cells. *J Nippon Med Sch*, 70 (4): 300-6 (2003).
- Morizono, K.; De Ugarte, D. A.; Zhu, M.; Zuk, P.; Elbarbary, A.; Ashjian, P.; Benhaim, P.; Chen, I. S.; and Hedrick, M. H. Multilineage cells from adipose tissue as gene delivery vehicles. *Hum Gene Ther*, 14 (1): 59-66 (2003).
- Orlic, D. Adult bone marrow stem cells regenerate myocardium in ischemic heart disease. *Ann NY Acad Sci*, 996: 152-7 (2003).
- Pittenger, M. F. et al.: Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 284 (5411): 143-7 (1999).
- Puissant, B. et al. Immunomodulatory effect of human adipose tissue-derived adult stem cells: comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. *Br J Haematol*, 129 (1): 118-29 (2005).
- Rasulov, M. F.; Vasilchenkov, A. V.; Onishchenko, N. A.; Krascheninnikov, M. E.; Kravchenko, V. I.; Gorshenin, T. L.; Pidtsan, R. E.; and Potapov, I. V. First experience of the use bone marrow mesenchymal stem cells for the treatment of a patient with deep skin burns. *Bull Exp Biol Med*, 139(1): 141-4 (2005).
- Rubio, D.; García-Castro, J.; Martín, M. C.; de la Fuente, R.; Cigudosa, J. C.; Lloyd, A. C.; and Bernad, A. Spontaneous human adult stem cell transformation. *Cancer Res*, 65 (8): 3035-9 (2005).
- Schachinger V, Erbs S, Elsasser A, et al. Intracoronary bone marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction. *N Engl J Med*; 355 (12): 1210-21 (2006).
- Sylvester, K. G., and Longaker, M. T. Stem cells: review and update. *Arch Surg*, 139(1): 93-9 (2004).
- Thorin-Trescases, N.; Voghel, G.; Gendron, M. E.; Krummen, S.; Farhat, N.; Drouin, A.; Perrault, L. P.; and Thorin, E. Pathological aging of the vascular endothelium: are endothelial progenitor cells the sentinels of the cardiovascular system? *Can J Cardiol*, 21 (12): 1019-24 (2005).
- Zuk, P. A. et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell*, 13 (12): 4279-95 (2002).
- Zuk, P. A.; Zhu, M.; Mizuno, H.; Huang, J.; Futrell, J. W.; Katz, A. J.; Benhaim, P.; Lorenz, H. P.; and Hedrick, M. H. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng*, 7 (2): 211-28 (2001).