

DOS AÑOS DE SEGUIMIENTO DE LOS PRIMEROS 5 CASOS SOBRE LA RECUPERACIÓN DE LA FUNCIÓN DE LA INCONTINENCIA ANAL TRAS LA INYECCIÓN DE GRASA MICRO-FRAGMENTADA (LIPOGEMS®).

A. Giori¹, C. Tremolada², R. Vailati¹, S.E. Navone³, G. Marfia³, A.I. Caplan⁴

1- Departamento de Cirugía General, Hospital Universitario San Paolo, Milán, Italia.

2- Instituto de Imagen, Milán, Italia.

3- Laboratorio de Neurocirugía y Terapia Celular Experimental, Unidad de Neurocirugía, Fondazione IRCCS Policlínico Ca'Granda Ospedale Maggiore, Universidad de Milán, Milán, Italia.

4- Departamento de Biología, del Centro de Investigaciones Esqueléticas de la Universidad de Case Western Reserve, Cleveland, Ohio, USA.

A. Giori y C. Tremolada contribuyeron igualmente a este trabajo.

ABSTRACTO

La incontinencia anal es una condición común que afecta significativamente a la calidad de vida. Este trabajo tiene como objetivo investigar el potencial terapéutico y regenerativo del Lipofilling de grasa lipoaspirada, lavada y reducida de tamaño mediante el nuevo dispositivo Lipogems®, en pacientes afectado por incontinencia fecal crónica. Se les realizó seguimiento durante 24 meses a 5 pacientes afectados por incontinencia fecal debido a lesiones obstétricas o debido a cirugía pélvica anorrectal. A estos pacientes se les injertó un promedio de 90 cc de grasa aspirada y micro fragmentada (Lipogems®) en la parte interna y externa de los esfínteres anales y alrededor de los nervios pudendos. Utilizamos la escala de Wexner para calcular el grado de incontinencia anal y la calidad de vida antes y después del tratamiento, junto con la exploración digital, proctoscopia, ecografía endoanal y manometría anorrectal.

Todos los pacientes observaron una mejora tanto a corto como a largo plazo. La escala de Wexner para la incontinencia mejoró de una media preoperatoria de 14,0 a 3,4 a los 3 meses después del tratamiento y se mantuvo estable hasta por 24 meses.

La manometría anorrectal reportó unas mejoras de la presión tanto en reposo como al contraer; mediante imagen ecográfica tomada a los 6 meses se pudo observar una reabsorción del tejido de Lipogems y a los 12 y a los 24 meses se mostraba una clara reparación del músculo. Nuestros resultados preliminares sugieren que este lipofilling regenerativo puede mejorar los síntomas de la incontinencia fecal causada por traumatismo local muscular y neural.

Son necesarios realizar más estudios para aclarar el mecanismo subyacente, pero, la acción paracrina de las células madre mensequimales contenidas en el tejido graso o en las células graso purificadas en sí mismas, se postulan, como a los 6 y a los 12 meses, cuando la ecografía de la grasa trasplantada muestra que el material inyectado desapareció, mientras que el beneficioso efecto clínico seguía estando presente y mostrando mejoras al transcurrir el tiempo.

Palabras clave: Incontinencia fecal, lesiones del esfínter anal, células madre mensequimales, Terapia regenerativa, Lipogems.

INTRODUCCIÓN

La incontinencia fecal es una condición de discapacidad con un fuerte impacto psicosocial que afecta del 2 al 15% de la población general,

aunque la estimación es claramente inferior a la realidad, por lo general, esta es causada por una variedad de condiciones que a menudo se derivan de una combinación de factores; sin embargo, la causa más común son las lesiones de los esfínteres anales, que a menudo están asociadas con daños a la innervación periférica, debido a una lesión obstétrica, a traumas o debido a una cirugía pélvica o anorrectal. Las opciones de tratamiento para la incontinencia severa, incluyen procedimientos quirúrgicos tales como la esfinteroplastia, la graciloplastia estimulada y la inserción de un esfínter artificial. Mientras que para las incontinencias leves y moderadas generalmente se reservan los tratamientos conservadores tales como las drogas, el entrenamiento del suelo pélvico, la formación, la biorretroalimentación y la estimulación del nervio sacro. Un tratamiento alternativo mínimamente invasivo es la inyección local de agentes de carga para aumentar el volumen del aparato del esfínter. Este procedimiento, en los cuales se emplean materiales biológicos o sintéticos, para mejorar la presión del esfínter anal, aunque estos procedimientos están muy limitados debido a la ausencia de dinamismo y de la contractilidad de los materiales los cuales también están sujetos a la migración y la resorción; sin embargo, inicialmente, las mejoras de la continencia obtenidas mediante esta técnica no se mantienen a largo plazo. La medicina regenerativa es una gran promesa para aquellos pacientes que muestran unas condiciones degenerativas o traumáticas severas, o para pacientes refractarios a tratamientos convencionales. En este contexto, las células madre mensequimales (MSC) han sido ampliamente estudiadas con respecto a sus potenciales aplicaciones terapéuticas; las MSC son células madre adultas multipotentes capaces de auto-renovarse y con un potencial de diferenciación; estas se encuentran en la médula ósea (BM-MSC) y en el tejido adiposo (ADSC); además, las MSCs producen factores secretados, tales como las citocinas, las quimiocinas, o los

factores de crecimiento, los cuales median en diversas funciones, a través de la intercomunicación entre diferentes tipos de células, estimulando la respuesta reparadora. Estudios recientes de medicina regenerativa han revelado que las Células Madre Mensequimales de Médula Ósea (RMSC-bm) son capaces de estimular al huésped para diferenciarse de células maduras de varios tejidos. En particular, aquellas células MSC-bm inyectadas a nivel musculo-esquelético las cuales generan condiciones favorables para el crecimiento de las células musculares en virtud de su actividad paracrina. Por otra parte, recientes investigaciones experimentales in vitro e in vivo han informado sobre el incremento en la regeneración de los nervios periféricos con el uso de las células MSCs-BM. Debido al fomento en el uso de las MSCs para reparar el daño muscular en modelos animales con incontinencia anal y urinaria inducidas, y sobre la base de resultados alentadores de estudios clínicos en pacientes con incontinencia anal y urinaria, hemos considerado emplear el tejido adiposo microfracturado, lavado y con notables propiedades regenerativas (Lipogems®) para la reparación en lesiones del esfínter anal en pacientes adultos con incontinencia fecal. Este nuevo procedimiento, derivado de la técnica quirúrgica del lipofilling, representa un nuevo campo en la cirugía regenerativa, cuyos criterios terapéuticos, están basados en la posibilidad de transferir las células medicinales que normalmente están presentes en varios tejidos del cuerpo de humanos adultos, tales como la médula ósea, la pulpa dental, y el tejido adiposo, en aquellas áreas dañadas del cuerpo humano que requieren reparación. Además las células MSC aisladas a partir de tejido adiposo, y en comparación con las de médula ósea, presentan algunas características peculiares; 1 g de tejido adiposo contiene 500 veces más células MSCs que 1 g de aspirado de la médula ósea; además de mostrar unos perfiles fenotípicos y transcripcionales similares a los de las MSCs, las ADSC expresan el antígeno

CD34, en los marcadores estromales y en los marcadores de las células endoteliales; además, las ADSC tienen un mayor rendimiento tras el aislamiento y una mayor tasa de proliferación en cultivo en comparación con las MSCs aisladas de otras fuentes y poseen capacidades de restauración que les hacen buenas candidatas para la terapia regenerativa. El tejido adiposo de los seres humanos, extraído mediante una suave liposucción, tratado mediante el uso de procesos mecánicos de micro fracturas, filtrado y lavado en un sistema completamente cerrado, el cual logra que se mantenga el potencial curativo de las MSCs contenidas en el tejido adiposo, evitando el uso de enzimas y/o cualquier otro aditivo. Estudios de biología celular han revelado que el producto celular de Lipogems® se compone de pequeñas agrupaciones esféricas de tejido adiposo, con una estructura conectiva microfragmentada intacta, mantenido viable el apoyo vascular, es particularmente rico en pericitos y en células MSCs las cuales se encuentran expuestas en la superficie del estroma vascular. Varios investigadores han planteado la hipótesis de que los pericitos son los precursores de las MSC, y de que su posición sobresaliente en el lumen endotelial de los vasos sanguíneos, las prepara para controlar y reaccionar a señales locales o sistémicas, estas propiedades contribuyen a que el tejido de Lipogems® sobreviva y facilitando el injerto cuando este se inocula de forma autóloga en el sitio de destino.

MATERIALES Y MÉTODOS

DECLARACIÓN DE ÉTICA Y RECOLECCION DE MUESTRAS

Este estudio fue realizado de acuerdo con la Declaración de Helsinki de junio de 2011, y se llevó a cabo con 5 pacientes (4 mujeres, 1 hombre), con edades comprendidas entre los 46 y 74 años (la media era de 61 años), con un historial de incontinencia fecal líquida y/o sólida por al menos, 12 meses, la condición fue confirmada por el registro que realizaron los

pacientes en los diarios de incontinencia, durante 2 semanas; estos fueron tratados para corregir la incontinencia fecal, mediante la inyección de Lipogems® en la región anal. La incontinencia fue provocada por lesiones anales del esfínter, por daños en los nervios periféricos, o la combinación de ambos, tal y como se muestra en la Tabla 1. Después del tratamiento, a los pacientes se les realizó seguimiento durante al menos 2 años; se les informó sobre los beneficios y los riesgos potenciales, estos dieron su consentimiento informado para el estudio el cual estaba aprobado por el Comité de Ética local. Antes del procedimiento con Lipogems, todos los pacientes fueron tratados con otros procedimientos y con rehabilitación, obteniendo unos resultados insatisfactorios. Por otra parte, los oncólogos proporcionaron su consentimiento para el tratamiento para aquellos pacientes con un historial previa de cáncer.

PROCEDIMIENTOS DE DIAGNÓSTICO

Antes del tratamiento, se evaluó la incontinencia anal utilizando la escala de Wexner para calcular el grado de incontinencia y la calidad de vida se evaluó mediante la Escalas de Gravedad y de Calidad de Vida Para la Incontinencia Fecal (FIQL); los pacientes fueron sometidos a examen digital del recto, a proctoscopias y a manometrías anorrectales (utilizando un catéter de 4 canales con perfusión de agua continua, Medtronic Polygram), también se realizaron ecografías endoanales para evaluar las lesiones de los esfínteres anales utilizando una sonda rotatoria de 10-MHz (Kretz ERW7-10AKP, Combison 401 GE Medical Systems). El tratamiento Lipogems® se llevó a cabo colocado al paciente en posición ginecológica o de litotomía., bajo anestesia general y en una sola sesión quirúrgica la cual incluyo 3 pasos distintos 1) La recolección de tejido adiposo del paciente; 2) Procesamiento de tejido adiposo con el dispositivo Lipogems®; 3) La re-inoculación del producto en el mismo paciente.

Tabla 1. Características clínicas de los pacientes.

Paciente	Historial	Escala de Wexner (0>20)	Ultrasonografía endoanal	Reflejos ano-cutáneos	Manometría anorrectal (valores en mmHg)
A) Mujer 61 años	A la edad de 27 años, parto difícil con laceración y episiotomía	11	Rupturas combinadas del EAE y del EAI localizadas en la zona anterior de los anillos musculares en la parte media y superior del canal anal	Normalmente presentes	Hipotonía en la presión de reposo; La baja presión incrementa la media de Presión en reposo =14 Presión máxima de reposo = 30; Presión media de contracción = 33 Presión máxima de contracción =56
B) Hombre 61 años	A la edad de 55 resección anterior del recto con anastomosis coloanal seguida de radioterapia y quimioterapia, para el cáncer rectal	14	Lesiones difusas del EAE y del EAI con áreas hipo e hiper-ecogénicas relacionado con la regresión fibrosa.	Deteriorado	Hipotonía en la presión en reposo, bajo presión que incrementa con la contracción. Media de la presión en reposo = 23 Presión máxima de reposo =28 Media de la presión de contracción =31 Presión máxima de contracción = 76
C) Mujer, 65 años	Desde la edad de 50 a los 56, reiteradas cirugías pélvicas y quimioterapia para un carcinoma de ovario	16	Sin evidencias de lesiones del esfínter anal	Inexistente	Hipotonía en la presión en reposo, dentro de los límites normales, la presión incrementa con la contracción Media de la presión en reposo = 43 Presión máxima de reposo =46 La media de la presión de contracción = 55 Presión máxima de contracción = 84
D) Mujer 46 años	Fractura del sacro durante su niñez, a los 34 años un alumbramiento difícil con laceración y la episiotomía.	13	Rupturas combinadas del EAE y del EAI localizadas en la zona anterior de los anillos musculares en la parte media y superior del canal anal	Normalmente presentes	Hipotonía en la presión en reposo, baja presión que incrementa con la contracción. Media de la presión en reposo = 14 Presión máxima de reposo =20 La media de la presión de contracción = 27 Presión máxima de contracción = 51
E) Mujer 76 años	No se reportaron datos significativos	16	Rupturas combinadas del EAE y del EAI localizadas en la zona anterior de los anillos musculares en la parte media e inferior del canal anal	Ausente	Hipotonía en la presión en reposo, bajo presión que incrementa con la contracción. Media de la presión en reposo =30 Presión máxima de reposo =35 La media de la presión de contracción = 39 Presión máxima de contracción = 49

*Esfínter anal externo (EAE), esfínter anal interno (EAI)

TRATAMIENTO LIPOGEMS

1. *Recolección de tejido adiposo.*

seleccionamos la parte baja o la parte lateral del abdomen, como los sitios donantes para la cosecha del injerto de grasa, utilizando una técnica derivada de la liposucción quirúrgica tradicional; para la succión de la grasa utilizamos una cánula sin filo de 13G, con múltiples orificios elípticos de 1x2 mm distribuidos a lo largo de esta; esta cánula desechable, estaba conectada con una jeringa de 10 cc, lo cual permitía una succión rápida y atraumática de la grasa, con unos pocos trazos de la cánula; la cosecha de la grasa fue realizada en 10 minutos después de la inyección de la solución salina y 1:500.000 de adrenalina en el área seleccionada.

2. *Tratamiento del tejido adiposo con el dispositivo Lipogems®*

La grasa aspirada fue procesada inmediatamente en el sistema cerrado Lipogems® (Figura 1); este dispositivo desechable reduce progresivamente el tamaño de los fragmentos de tejido adiposo de grupos esferoidales con diámetros de entre 2,5 a 3,5 mm a micro grupos de 400 a 900 micras, mientras elimina los residuos oleosos y de sangre, los cuales tienen propiedades pro-inflamatorias. El proceso mecánico del microfracturado, lavado y filtrado tiene lugar en un sistema completamente sumergido en una solución fisiológica evitando la presencia de aire, con el fin de hacer posible la reducción del volumen, minimizando cualquier acción traumática en los productos celulares. El sistema permite la recolección del tejido adiposo microfracturado de Lipogems® rico en pericitos y en células MSCs, los cuales están naturalmente presentes en el nicho del tejido adiposo. El tejido graso purificado de Lipogems fue recogido en una jeringa de 60 cc y posicionado para decantar suavemente por gravedad a fin de eliminar el exceso de solución salina; a continuación, el producto de tejido de

Lipogems fue transferido en varias jeringas de 1 cc para ser re-inyectado en el mismo paciente.

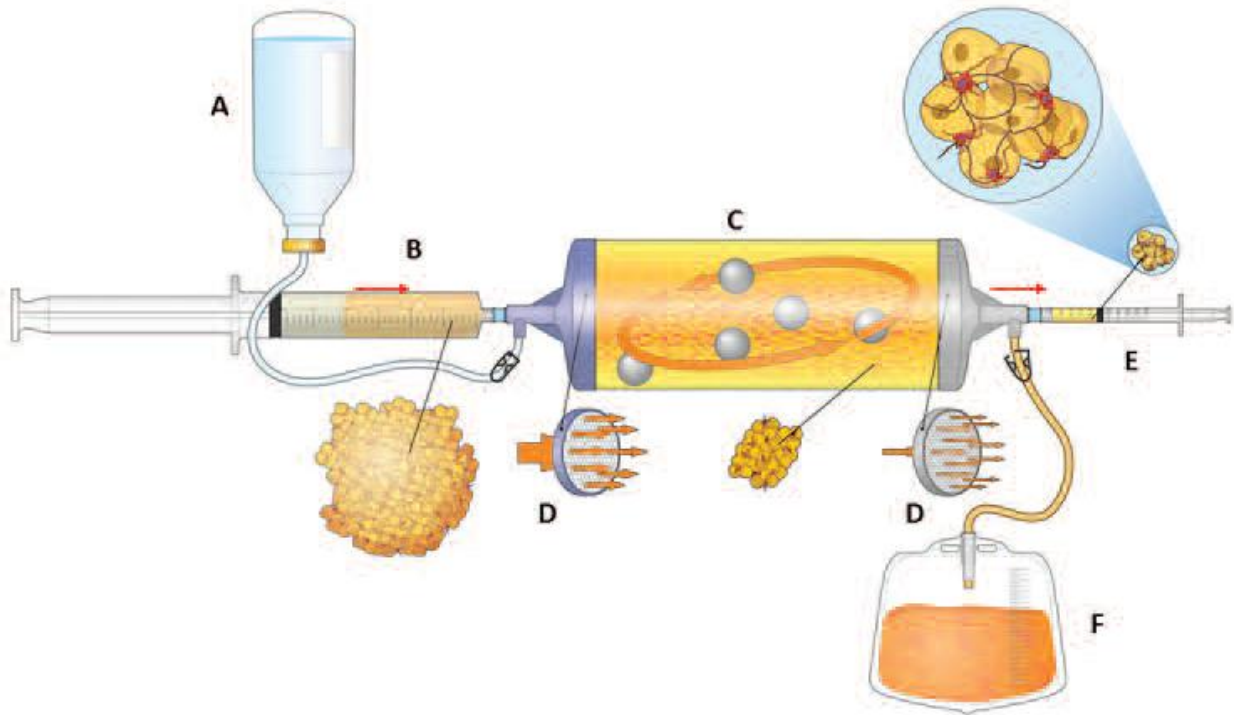
3. *La re-inoculación en el paciente*

Mediante la guía del ultrasonido endoanal, se identificó el esfínter anal interno y externo (Figura2); utilizando una cánula especial de 19G, desechable, con punta roma, se inocular el tejido Lipogems® en los defectos musculares en el espacio interesfinteriano (figura 2b) y circularmente alrededor de todas las porciones del esfínter anal externo restantes (Figura 2c). Se emplearon jeringuillas del tipo Luer-Lock desde 1 ml para inyectar la cantidad ideal de tejido en cada tratamiento. En los pacientes B, C, y E, se observaron diversos grados de deficiencia en la inervación de los músculos del esfínter, también se inyectó Lipogems® a lo largo del curso de los nervios pudendos, empleando una técnica transperineal, guiada mediante ultrasonido, se inyectó el micro injerto de grasa en múltiples túneles dentro de los tejidos, teniendo especial cuidado de depositarlo en pequeñas cantidades (1 ml) en un solo lugar a la vez, de distal a proximal.

Después del procedimiento, se evaluó el dolor postoperatorio mediante la compilación de una escala numérica visual (VNS, con una puntuación de 0-10); se volvieron a evaluar a todos los pacientes a los 3, 6, 12, 18 y 24 meses desde el tratamiento inicial, para reevaluar la contractilidad fisiológica, los síntomas de los esfínteres anales, la calidad de vida y las características ecográficas en el área en la que se realizó la inoculación de Lipogems® repitiendo los mismos exámenes preoperatorios. Los procedimientos quirúrgicos fueron realizados mediante A.G. y T.C.; todos los exámenes de diagnóstico, preoperatorios y postoperatorios fueron realizados por A.G. y por otro investigador independiente R.V.

Figura 1. DISPOSITIVO LIPOGEMS.

El dispositivo Lipogems dispositivo es un sistema completamente cerrado lleno con solución fisiológica, esto permite la reducción del tamaño de las agrupaciones lipoaspiradas después del lavado de los residuos oleosos sangre y de restos celulares. Un saco con solución fisiológica; SEGUNDO, Jeringa con racimos lipoaspirados; C, La cámara de lavado la cual contienen las canicas para emulsionar el fluido y mediante la gravedad eliminar los residuos de sangre y aceites; D, filtros Mecánicos; E, Jeringa con racimos de tamaño reducido; F, Saco con los residuos de aceite y sangre.



ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados se expresaron como media $\pm$ (desviación estándar) la relevancia estadística se determinó mediante una prueba bilateral t Student. Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas de $p < 0,05$

RESULTADOS

PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO

El procedimiento fue completado con éxito en los 5 pacientes, no hubo complicaciones intraoperatorias o postoperatorias; el tiempo promedio de operación, incluidas las tres fases diferentes de recolección, procesamiento y la reintroducción de la sustancia, fue de 73 minutos, empleando la mayor parte del tiempo en la reinyección. De cada uno de los pacientes se recogió un promedio de 330 cc de

lipoaspirado; como resultado del procesamiento mediante la técnica de Lipogems®, la cantidad media de producto obtenida y lista para la reinyección en pacientes, fue de 90cc. Durante los procedimientos, no hubo problemas de acumulaciones anormales en el producto de Lipogems®, ni se produjo obstrucción de las agujas empleadas.

CALIDAD DE VIDA

Los pacientes toleraron bien el procedimiento y la media del dolor postoperatorio, fue evaluado mediante la terapia con estimulador del nervio vago (ENV) (con puntuación de 0-10) y los resultados fueron de 1,4, los cuales recaían principalmente en el sitio de la succión de la grasa abdominal; la hospitalización postoperatoria fue de 1 día para todos los pacientes; la

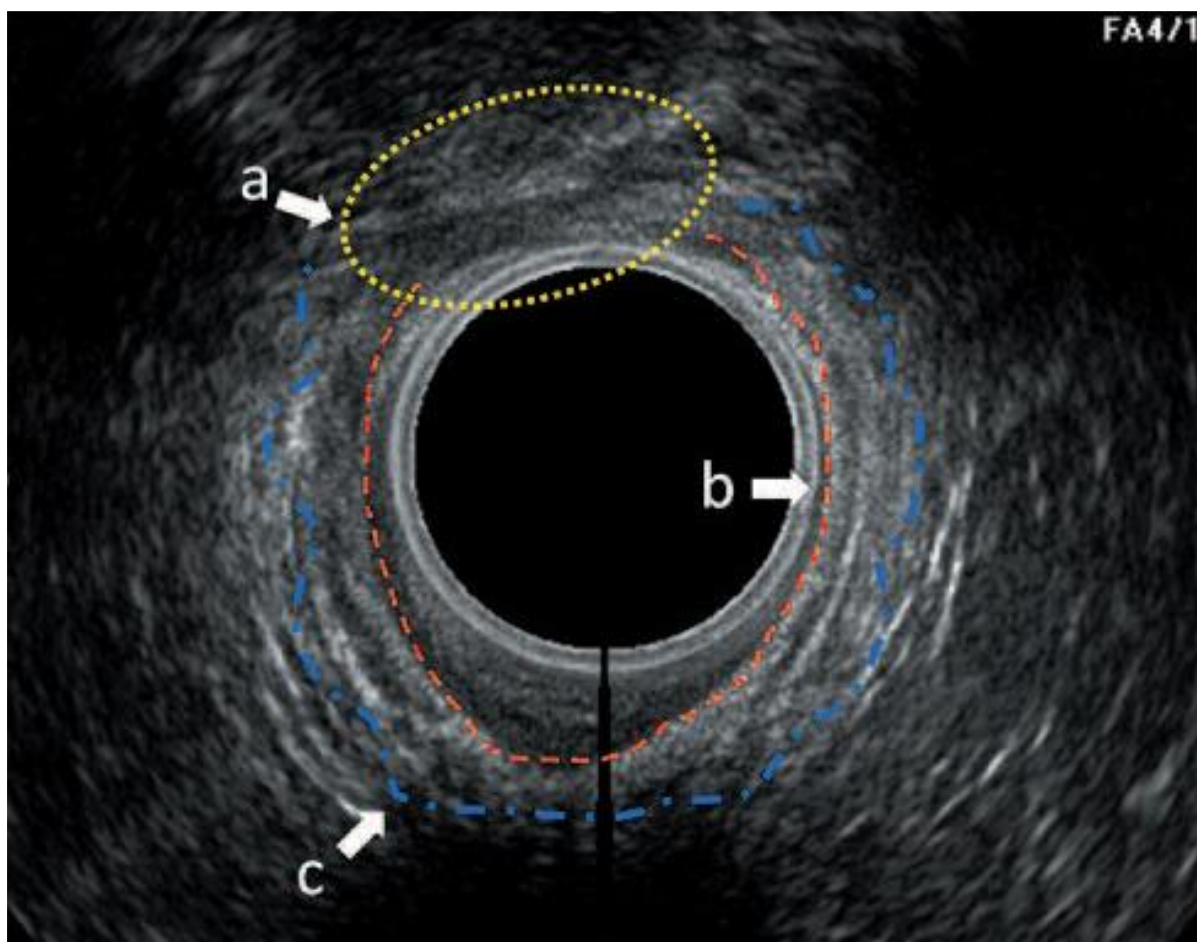


Figura 2. Inyección de Lipogems.

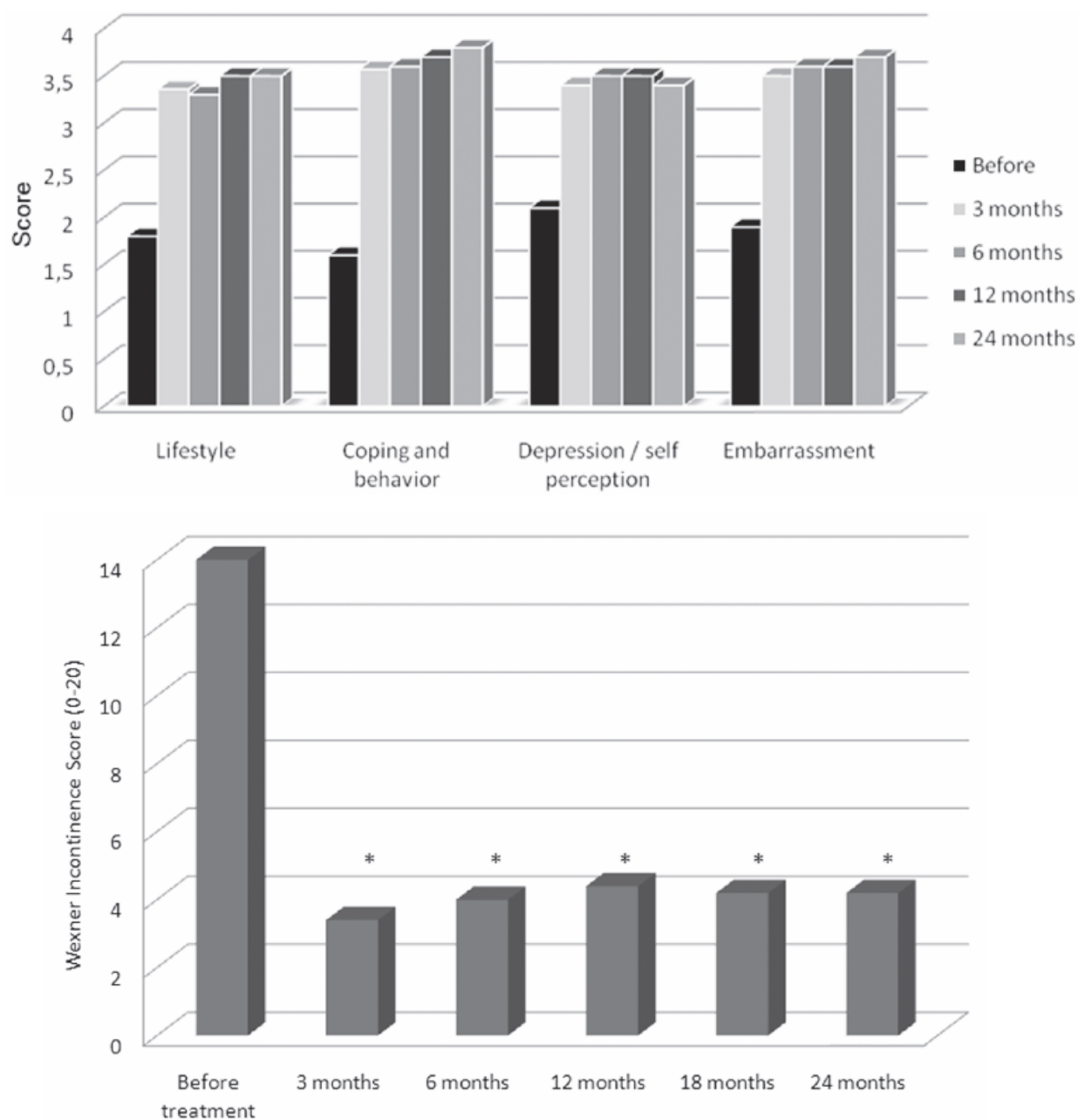
Áreas de inoculación de Lipogems (Imagen de la ecografía endoanal en el nivel medio del canal anal). A) Defectos externos e internos del esfínter anal; D), espacio interesfinteriano; C), Zona periférica del esfínter externo.

satisfacción de todos los pacientes por el tratamiento fue muy buena y la media de la escala para la calidad de vida para pacientes con incontinencia fecal (FIQL) tuvo un aumento, en comparación con los valores preoperatorios; después de 3 meses del tratamiento, el estilo de vida mejoró de 1.8 a 3.4, el afrontamiento de la condición de 1.6 a 3.6, la depresión de 2,1 a 3,4 y la incomodidad de 1.9 a 3,5, estas permanecieron bastante estables, durante los 2 años de seguimiento, como se muestra en la Figura 3.

En los 5 pacientes registramos una mejora significativa en los valores promedios en general; la puntuación de la escala Wexner los valores cambiaron desde el preoperatorio de 14,0 a 3,4 en la valoración realizada a los 3 meses después del tratamiento; de 4,0 a los 6 meses y a un valor de 4,4 al año. Durante el segundo año de seguimiento los valores se mantuvieron estables con una tendencia a la mejora moderada, registrando valores de 4,2 a los 18 meses y de 4,2 a los 24 meses (Figura 4).

Figura 3. INCONTINENCIA FECAL

Puntuación de la Calidad de vida. Cambios en La Puntuación de calidad de vida en pacientes con incontinencia fecal en los 5 pacientes antes y 3,6, 12, 24 meses después del tratamiento con Lipogems.

**Figura 4. PUNTUACIÓN PARA LA INCONTINENCIA DE WEXNER.**

*los valores Promedios de la puntuación para la incontinencia de Wexner (0-20) para todos los pacientes inscritos antes y después del tratamiento con Lipogems. * $p < 0,05$.*

Por otra parte, la comparación en la puntuación de la incontinencia de Wexner, medida antes de la implantación y a los 3, 6, 12, 18, 24 meses en los 5 pacientes, esta indicó una reducción significativa, la cual disminuyó en una media de 14.0 unidades a 3,4 unidades en 3 meses y se mantuvo estable durante todo el tiempo de nuestro estudio (Figura 5).

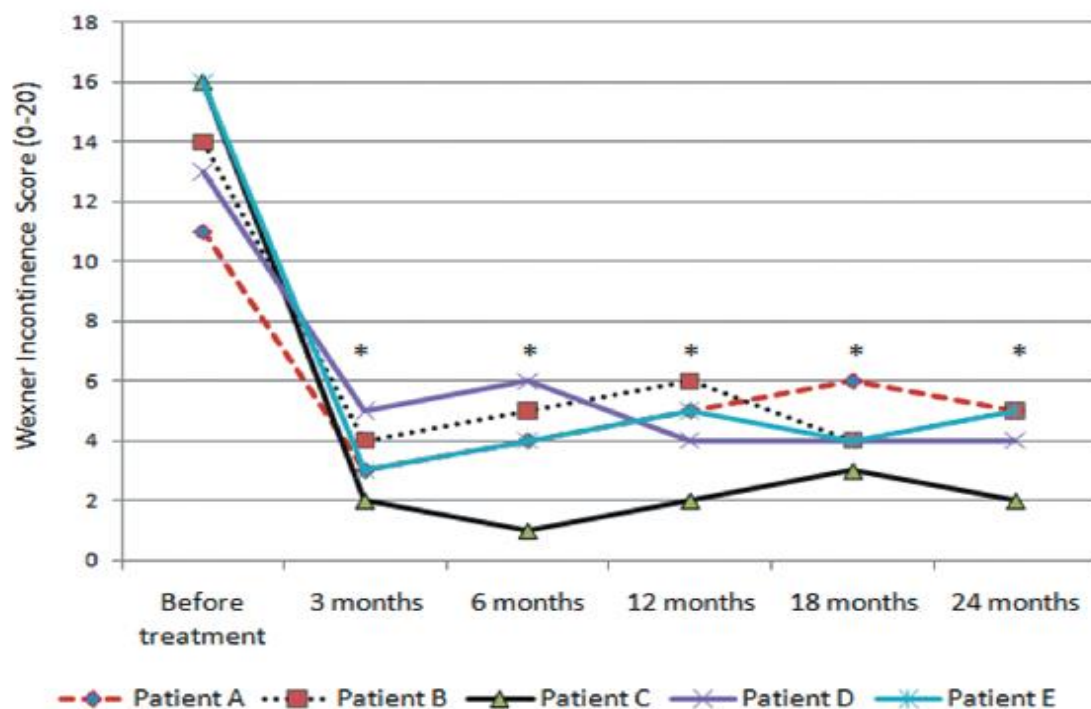
HALLAZGOS MANOMÉTRICOS

Los hallazgos manométricos también reportaron mejoras globales después del tratamiento, los valores medios en reposo y en contracción de la presión anal que fueron registrados por la manometría anorrectal, mostró mejoría en los cinco pacientes tal y como se indica en la gráfica (Figura 6). De hecho, antes de la terapia regenerativa el valor medio en reposo era de 24 mmHg y en contracción de 39 mmHg, el cual aumentó, respectivamente, a 34 mmHg y 80.

mmHg a los 3 meses, a 38 mmHg y 90 mmHg a los 6 meses, a 35 mmHg y 96 mmHg a los 12 meses, a 52 mmHg y 117 mmHg a los 18 meses y a 45 mmHg y 112 mmHg a los 24 meses. Se dieron resultados similares para la presión en reposo y en contracción, las cuales aumentaron respectivamente, de una media de 38 y 72 mmHg al inicio del estudio; de 58 y 112 mmHg a los 3 meses; de 56 y 120 mmHg a los 6 meses; de 48 y 137 mmHg a 12 meses; de 64 y 172 mmHg a los 18 meses y de 63 y 170 mmHg a los 24 meses después del procedimiento (Figura 6).

Resulta interesante el claro aumento que hubo de la presión de la contracción anal registrada en todos los pacientes 12 meses después del tratamiento; de hecho, la capacidad de contracción de los esfínteres aumentó significativamente después del tratamiento con Lipogems® (Figura 7).

Figura 5. EVOLUCIÓN DE LA PUNTUACION PARA LA INCONTINENCIA DE WEXNER. La tendencia de la puntuación para la Incontinencia de Wexner (0-20) para cada paciente antes y a los 3, 6, 12, 18, 24 meses después del tratamiento con Lipogems. * $P < 0,05$.



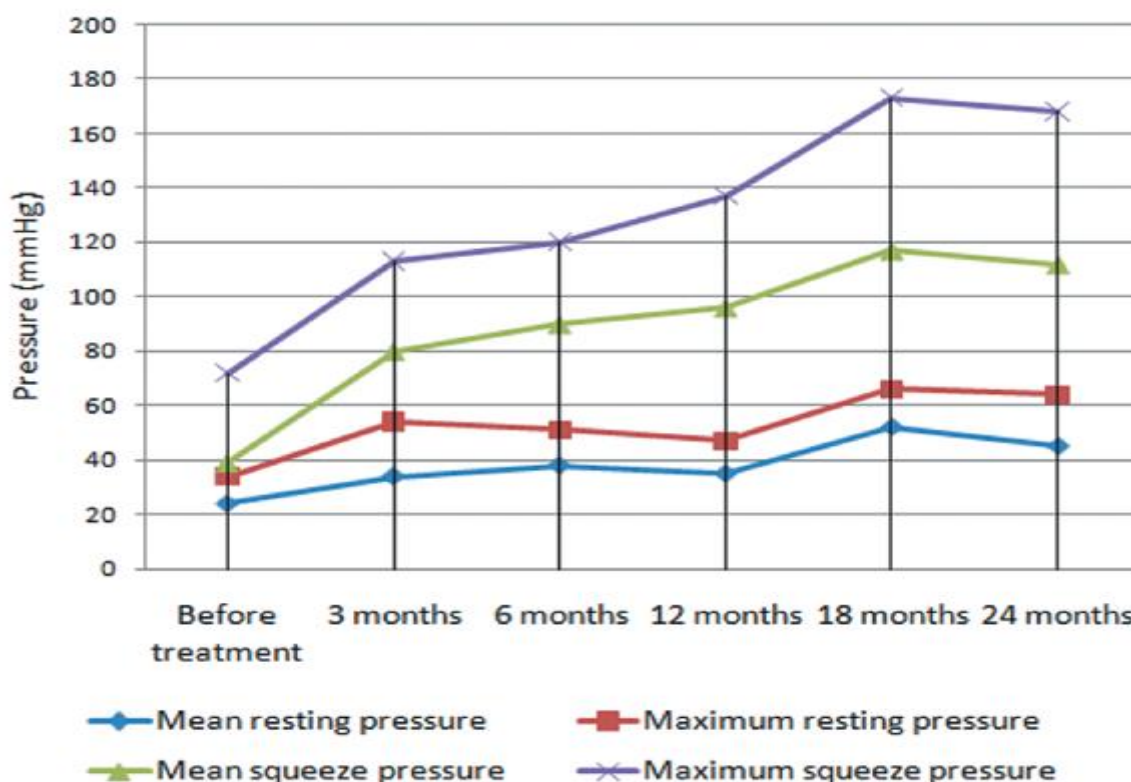


FIGURA 6. PROMEDIO Y PRESION ANAL MAXIMA AL CONTRAER Y EN REPOSO: *Cambios en la media y en la puntuación de presión anal máxima al contraer y en reposo de los 5 pacientes antes y 3, 6, 12, 18, 24 meses después del tratamiento Lipogems.*

EXAMEN FÍSICO

3 meses después del tratamiento las relajaciones detectadas previamente en los esfínteres de todos los pacientes ya no eran apreciables, estas se habían sustituido por un efecto de relleno en el canal anal cuyas paredes al ser palpadas manualmente eran suaves y elásticas; de los 6 a los 12 meses se evidencio clínicamente una reducción en el relleno del canal anal, el cual se mantuvo hasta por 24 meses; pero al mismo tiempo, desde los 6 hasta los 24 meses se observó mediante la palpación claramente un aumento progresivo en la actividad contráctil de los esfínteres anales y después de 3 meses se apreció en los pacientes C y E la presencia de un reflejo anocutaneo moderado, el cual no estuvo presente antes del tratamiento, mientras que en el paciente B) se evidenció un reflejo más activo.

HALLAZGOS ECOGRÁFICOS

Durante el tratamiento intraoperatorio con Lipogems®, en comparación con la imagen ecográfica endoanal preoperatoria (Figura 8), mediante la imagen los depósitos de Lipogems® podían ser identificados como puntos hiperecoicos (Figura 8 b) Tres meses después del tratamiento con Lipogems®, la ultrasonografía endoanal mostro la resorción inicial de los depósitos de Lipogems con la persistencia de los puntos hiperecoicos, generalizados en los sitios de inoculación (Figura 8c). De los 6 a los 12 meses la ecografía detectó una reabsorción progresiva de los puntos hiperecoicos del producto de tejido Lipogems (Figura 8d). Al mismo tiempo, la ultrasonografía endoanal identifico un incremento de la fibra muscular en el sitio de la lesión, con una recuperación del círculo de los esfínteres anales, a los 24 meses aún estaban presentes cuando los depósitos de tejido Lipogems ya no eran evidentes (Figura 8e, 8f).

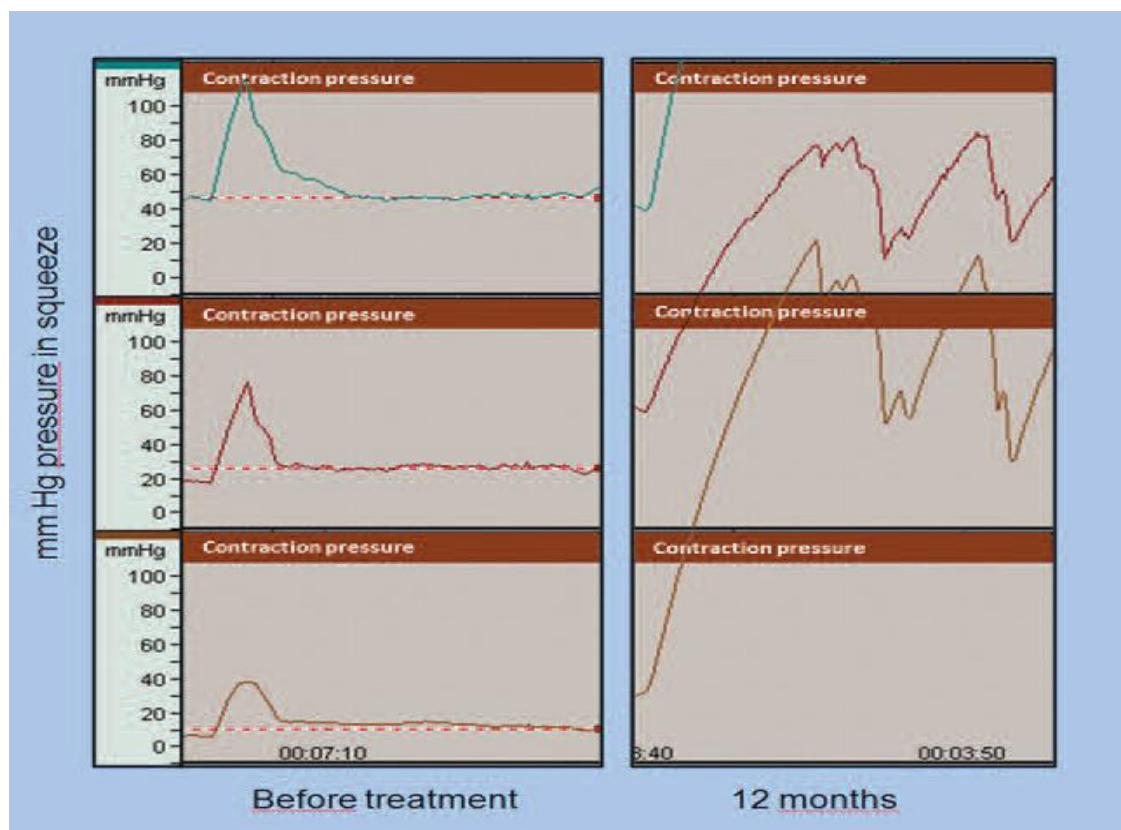


Figura 7. CURVAS MANOMÉTRICAS.

Paciente A) curvas manométricas en la compresión registrada antes de los 12 meses y después del tratamiento con Lipogems

DISCUSIÓN

Como resultado de informes preliminares sobre la eficacia y la seguridad para diferentes especialidades médicas, de la terapia regenerativa, con el uso de células madre autólogas, recién cosechadas o expandidas en cultivos, han sido utilizadas recientemente para el tratamiento de aquellas condiciones que por lo general no han podido ser curadas y que dan lugar a unos resultados pobres o a cirugías invasivas. En los últimos años, las células madre autólogas se han utilizado para el tratamiento experimental en pacientes con incontinencia urinaria y/o anal. En estos estudios, la médula ósea y el tejido muscular constituyen la fuente de la que con más frecuencia se obtienen las células MSCs adultas, aunque esta población de células es bastante rara en estos tejidos (0,001% -

0.01%); recientemente, el tejido adiposo humano se ha identificado como una fuente conveniente para la cosecha de células MSCs, denominadas genéricamente como células madre "derivadas de tejido adiposo" (ADSC). En este estudio se reporta, por primera vez, el uso de un producto regenerativo proveniente del tejido graso (Lipogems®) obtenido mediante un método cerrado, no enzimático, para tratar pacientes con incontinencia anal. Otras observaciones in vitro indican que las MSC están encapsuladas en la preparación de células de grasa y son los agentes activos del procedimiento Lipogems®.

El tejido Lipogems se presenta como un procedimiento para el injerto de grasa, pero el tejido graso que se inyecta, en comparación con el lipoaspirado estándar, está compuesto de pequeñas

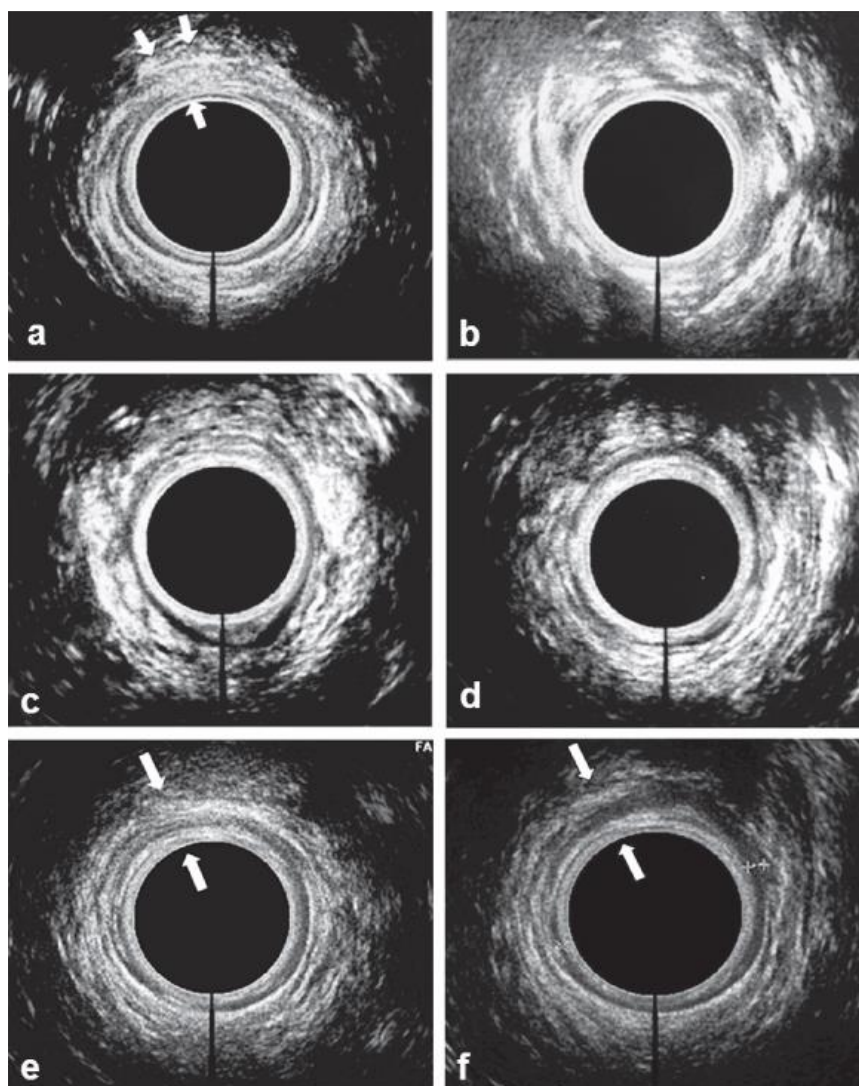


FIGURA 8. ULTRASONOGRAFÍA ENDO-ANAL. IMÁGENES ECOGRÁFICAS REPRESENTATIVA DE UNO DE LOS PACIENTES.

Paciente A), en el preoperatorio, en la etapa intraoperatoria y a los 3, 6, 12, 24 meses después del tratamiento. ecografía endoanal preoperatoria*. Lesión en el esfínter anal interno y externo localizada en la parte área anterior de los anillos musculares; B, ecografía intraoperatoria* puntos difusos hipoeoicos en los sitios de la inoculación de Lipogems; C, ecografía* en el 3er mes. reabsorción parcial de los puntos hipoeoicos de Lipogems; D, ecografía * en el 6º mes. Aspecto del desarrollo inicial de las fibras del nuevo músculo en el sitio de las lesiones. Aún son evidentes algunos puntos hipoeoicos de Lipogems; E, y F, la ecografía *, en los 12ª y 24ªmes respectivamente. La imagen muestra una especie de reparación del músculo, sin más evidencias de depósitos hipoeoicos de Lipogems* (Escaneada a mediados del nivel del canal anal).

pequeñas agrupaciones con pericitos y células MSCs viables e intactas, las cuales conservan su nicho natural. La particular alta concentración de la fracción del estroma vascular presentes en los grupos de tejido de Lipogems®, después de haber eliminado la mayor parte de células de grasa durante el procesamiento en el dispositivo, también es detectable por las características de la imagen de ultrasonido, logrado mediante la ecografía endoanal; de hecho, en el escáner del ultrasonido, las áreas de inoculación del producto Lipogems® aparece como hiperecoica, es un indicativo de una alta concentración de células hiperdensas (Figura 8b), mientras que el tejido adiposo tiene una densidad menor lo cual ofrece unas imágenes ecografías hipoeoicas. La técnica con esta inyección en los pacientes ha demostrado ser un procedimiento mínimamente traumática y muy

suave debido a la naturaleza fluida de Lipogems® el cual puede pasar fácilmente a través de agujas de punta roma, finas y afiladas (de 21 hasta 25 gubias) que pueden ser distribuidas uniformemente en el tejido designado. El método de distribución del injerto de grasa micro fragmentada que hemos empleado (Figuras 2, 8), más que aportar un efecto favorable para el aumento de volumen del canal anal, proporciona sustancias capaces de reparar las lesiones del aparato del esfínter anal, relacionadas con los músculos y los nervios. Ya que la incontinencia fecal provoca una considerable aprensión, empleamos las herramientas para implicarnos en la calidad de vida del paciente. Hemos demostrado que después del tratamiento con Lipogems®, el cuestionario de calidad de vida para la incontinencia anal FIQL, incrementó para todos los pacientes desde el preoperatorio; en efecto, en cuanto a la

puntuación FIQL descrita por Rockwood en la evaluación psicométrica, la cual estuvo basada en cuatro escala (estilo de vida, afrontamiento, comportamiento, depresión/autopercepción y la vergüenza) en pacientes afectados por incontinencia fecal, así como en aquellos sujetos que no padecían de incontinencia fecal, sino, de otros problemas gastrointestinales (Grupo de control). En este estudio nuestros pacientes, mostraron los mismos valores que la población de control después de 3 meses de tratamiento y durante todo el período de seguimiento, ($3 < \text{FIQL} < 4$). Mediante la comparación de los datos de los pacientes, en nuestra experiencia, observamos un ligero empeoramiento de los síntomas de la incontinencia simultánea con una disminución moderada de la presión de reposo en el intervalo entre el 3er mes y el mes 12 (Figuras 5, 6). En este mismo período de tiempo, la ecografía endoanal reveló que los depósitos inoculados de Lipogems®, fueron gradualmente reabsorbidos, tal y como se evidencia en la Figura 8c, 8d; posteriormente, entre los 12 y los 24 meses se produjo una estabilización de los síntomas de la incontinencia, mientras que hubo un pequeño aumento de la presión en reposo, asociado con un notable aumento de la presión media de compresión y en la compresión máxima. Durante el segundo año de seguimiento, después de la absorción del componente celular del tejido adiposo, se pudo observar mediante las imágenes de ultrasonido que el esfínter anal se había reparado con una "restitutio ad integrum" de las fibras musculares (Figura 8e). El ligero empeoramiento de los síntomas de la incontinencia entre el 3er mes y los 12 meses, en nuestra opinión, estuvo atribuido a la absorción de los componentes adiposos de Lipogems® con una disminución en el efecto del aumento de volumen, el cual ocurre generalmente después de 6 meses a 1 año, este efecto también puede ser observado cuando se emplean tratamientos con técnicas tradicionales de lipofilling, pero este siempre requiere de numerosos rellenos. Una de las características atractivas del producto fue el claro aumento de la capacidad contráctil de los esfínteres registrados mediante una manometría anorrectal llevada a cabo después de 12 meses; cuando los depósitos del material inoculado habían desaparecido y las imágenes de ultrasonido mostraban la reparación del músculo (figuras 6,7). Frudinger et al, vertió unos informes sobre el uso de células de mioblasto autólogas, cultivadas a partir

de una biopsia del músculo pectoral, las cuales fueron inyectadas en defectos del esfínter anal para el tratamiento de pacientes con incontinencia anal, debido a lesiones obstétricas; estos informes indicaron que solo hubo un incremento transitorio de la presión máxima de la contracción anal, en las evaluaciones realizadas en el primer mes y a los 6 meses, volviendo a los valores basales a los 12 meses después del tratamiento. Mientras que Frudinger et al han utilizado células derivadas de los músculos, preparadas mediante procedimientos enzimáticos/químicos y cultivadas, nosotros empleamos un injerto de tejido preparado mecánicamente y en una sola sesión quirúrgica. El injerto de tejido Lipogems® preserva la microestructura del tejido con un nicho intacto, que permite una "Unidad regenerativa" funcional. De esta manera, las células MSCs y los pericitos contenidos en el nicho están probablemente más disponibles y funcionalmente intactos que las células aisladas, que son inyectadas para promover la regeneración tisular. En nuestra experiencia inicial, ¿es posible que la activación de las MSCs haya producido la reparación del músculo? Esta sugerencia fue apoyada por las impresiones de otros autores y por estudios in vivo e in vitro sobre la capacidad de las MSCs para producir la regeneración de las células músculo-esqueléticas.

En un estudio realizado recientemente por Lorenzi, en donde se describe el tratamiento con inyección de BM-MSC para tratar lesiones inducidas artificialmente en el esfínter anal de ratas. adicionalmente a los resultados funcionales, este evaluó los exámenes histológicos realizado en aquellos animales sacrificados; este describió una zona rica en células musculares irregulares de distintos tamaños, las cuales indicaban la presencia de una regeneración selectiva de los esfínteres anales. En un artículo reciente, Kajbafzadeh investigo acerca de la inoculación de células musculares autólogas, progenitoras, en conejos, que fueron previamente sometidos a una esfinterotomía anal externa. Además de una contractilidad anal mejorada, evidenciada mediante manometría, los estudios histomorfológicos para daños externos al esfínter anal, detecto una significativa disminución de la fibrosis intersticial, asociado a la regeneración de las fibras musculares, con una significativa orientación variable para la nueva regeneración de la fibra muscular. La mejora de la contractilidad y

de la incontinencia anal registradas en el paciente B y E) y especialmente en el paciente C, fueron notables con respecto a la mejora de la función nerviosa periférica; los mecanismo de este beneficioso efecto no están claros aun: podríamos hipotetizar sobre varios tipos de mecanismos, tales como el de la estimulación, la neovascularización, la inmunomodulación y la influencia neurotrópica; sin embargo, en la literatura solo existen estudios experimentales sobre la regeneración de nervios periféricos con el uso de células MSCs, pero, no hay evidencia clínica de que los nervios periféricos vuelva a crecer después de la terapia regenerativa con células MSCs. Esta observación es ciertamente muy sugerente, pero deberá ser verificada con investigaciones más detalladas.

CONCLUSION:

Esta nueva técnica parece dar notables resultados clínicos, con un procedimiento de regeneración muy simple y un proceso quirúrgico mínimamente traumático, el cual es muy bien tolerado por los pacientes.

DECLARACIÓN DE INTERESES

Carlo Tremolada es el inventor de la propiedad intelectual que ha sido utilizada en este estudio y es poseedor de acciones en Lipogems Internacional, SpA, titular de la licencia de las patentes utilizadas en este estudio.

REFERENCIAS

- Macmillan AK, Merrie AE, Marshall RJ, Parry BR. The prevalence of fecal incontinence in community-dwelling adults: a systematic review of the literature. *Dis Colon Rectum* 2004; 47: 1341-1349.
- Rothbarth J, Bemelman WA, Meijerink WJ, Stiggelbout AM, Zwinderman AH, Buyze-Westerweel ME, Delemarre JB. What is the impact of fecal incontinence on quality of life? *Dis Colon Rectum* 2001; 44: 67-71.
- Sultan AH, Kamm MA, Hudson CN, Thomas JM, Bartram CI. Anal-sphincter disruption during vaginal delivery. *N Engl J Med* 1993; 329: 1905-1911.
- Lindsey I, Jones OM, Smilgin-Humphreys MM, Cunningham C, Mortensen NJ. Patterns of fecal incontinence after anal surgery. *Dis Colon Rectum* 2004; 47:1643-1649.
- Oberwalder M, Dinnewitzer A, Baig MK, Thaler K, Cotman K, Nogueras JJ, Weiss EG, Efron J, Vernava AM 3rd, Wexner SD. The association between late-onset fecal incontinence and obstetric anal sphincter defects. *Arch Surg* 2004; 139: 429-432.
- Vaizey CJ, Norton C, Thornton MJ, Nicholls RJ, Kamm MA. Long-term results of repeat anterior anal sphincter repair. *Dis Colon Rectum* 2004; 47: 858-863.
- Zorcolo L, Covotta L, Bartolo DC. Outcome of anterior sphincter repair for obstetric injury: comparison of early and late results. *Dis Colon Rectum* 2005; 48: 524-531.
- Baeten CG, Bailey HR, Bakka A, Belliveau P, Berg E, Buie WD, Burnstein MJ, Christiansen J, Collier JA, Galandiuk S, LaFontaine LJ, Lange J, Madoff RD, Matzel KE, Pahlman L, Parc R, Reilly JC, Seccia M, Thorson AG, Vernava AM 3rd, Wexner S. Safety and efficacy of dynamic graciloplasty for fecal incontinence: report of a prospective, multicenter trial. *Dynamic Graciloplasty Therapy Study Group. Dis Colon Rectum* 2000; 43: 743-751.
- Lehur PA, Glemain P, Bruley des Varannes S, Buzelin JM, Leborgne J. Outcome of patients with an implanted artificial anal sphincter for severe faecal incontinence: a single institution report. *Int J Colorectal Dis* 1998; 13: 88-92.
- Norderval S, Oian P, Revhaug A, Vonen B. Anal incontinence after obstetric sphincter tears: outcome of anatomic primary repairs. *Dis Colon Rectum* 2005; 48: 1055-1061.
- Vonthein R, Heimerl T, Schwandner T, Ziegler A. Electrical stimulation and biofeedback for the treatment of fecal incontinence: a systematic review. *Int J Colorectal Dis* 2013; 28: 1567-1577.
- Lim JT, Hastie IA, Hiscock RJ, Shedda SM. Sacral nerve stimulation for fecal incontinence: long-term outcomes. *Dis Colon Rectum* 2011; 54: 969-974.
- Shafik A. Perianal injection of autologous fat for treatment of sphincteric incontinence. *Dis Colon Rectum* 1995; 38: 583-587.
- Shafik A. Polytetrafluoroethylene injection for the treatment of partial fecal incontinence. *Int Surg* 1993; 78: 159-161.
- Vaizey CJ, Kamm MA. Injectable bulking agents for treating faecal incontinence. *Br J Surg* 2005; 92: 521-527.
- Ratto C, Parello A, Donisi L, Litta F, De Simone V, Spazzafumo L, Giordano P. Novel bulking agent for faecal incontinence. *Br J Surg* 2011; 98: 1644-1652.
- Bernardo ME, Pagliara D, Locatelli F. Mesenchymal stromal cell therapy: a revolution in Regenerative Medicine? *Bone Marrow Transplant* 2012; 47: 164-171.
- Caplan AI. Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. *J Cell Physiol* 2007; 213: 341-347.
- Caplan AI, Dennis JE. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J Cell Biochem* 2006; 98: 1076-1084.
- Caplan AI, Correa D. The MSC: an injury drugstore. *Cell Stem Cell* 2011; 9: 11-15.
- Herzog EL, Chai L, Krause DS. Plasticity of marrow-derived stem cells. *Blood* 2003; 102: 3483-3493.
- Muguruma Y, Reyes M, Nakamura Y, Sato T, Matsuzawa

H, Miyatake H, Akatsuka A, Itoh J, Yahata T, Ando K, Kato S, Hotta T. In vivo and in vitro differentiation of myocytes from human bone marrow-derived multipotent progenitor cells. *Exp Hematol* 2003; 31: 1323-1330.

23. Santa María L, Rojas CV, Minguell JJ. Signals from damaged

but not undamaged skeletal muscle induce myogenic differentiation of rat bone-marrow-derived mesenchymal stem cells. *Exp Cell Res* 2004; 300: 418-426.

24. Bossolasco P, Corti S, Strazzer S, Borsotti C, Del Bo R, Fortunato F, Salani S, Quirici N, Bertolini F, Gobbi A, Delilieri GL, Pietro Comi G, Soligo D. Skeletal muscle differentiation potential of human adult bone marrow cells. *Exp Cell Res* 2004; 295: 66-78.

A. Giori, C. Tremolada, R. Vailati, S.E. Navone, G. 10 Marfia, A.I. Caplan

25. Park BW, Kang DH, Kang EJ, Byun JH, Lee JS, Maeng GH, Rho GJ. Peripheral nerve regeneration using autologous porcine skin-derived mesenchymal stem cells. *J Tissue Eng Regen Med* 2012; 6: 113-124.

26. Matthes SM, Reimers K, Janssen I, Liebsch C, Kocsis JD, Vogt PM, Radtke C. Intravenous transplantation of mesenchymal stromal cells to enhance peripheral nerve regeneration. *Biomed Res Int* 2013; 2013: 573169.

27. Frattini F, Lopes FR, Almeida FM, Rodrigues RF, Boldrini

LC, Tomaz MA, Baptista AF, Melo PA, Martinez AM. Mesenchymal stem cells in a polycaprolactone conduit promote

sciatic nerve regeneration and sensory neuron survival after nerve injury. *Tissue Eng Part A* 2012; 18: 2030-2039.

28. Pereira Lopes FR, Frattini F, Marques SA, Almeida FM, de Moura Campos LC, Langone F, Lora S, Borojovic R, Martinez AM. Transplantation of bone-marrow-derived cells into a nerve guide resulted in transdifferentiation into Schwann cells and effective regeneration of transected mouse sciatic nerve. *Micron* 2010; 41: 783-790.

29. Yiou R, Yoo JJ, Atala A. Restoration of functional motor units in a rat model of sphincter injury by muscle precursor cell autografts. *Transplantation* 2003; 76: 1053-1060.

30. Yiou R, Dreyfus P, Chopin DK, Abbou CC, Lefaucheur JP.

Muscle precursor cell autografting in a murine model of urethral sphincter injury. *BJU Int* 2002; 89: 298-302.

31. Lorenzi B, Pessina F, Lorenzoni P, Urbani S, Vernillo R,

Sgaragli G, Gerli R, Mazzanti B, Bosi A, Saccardi R, Lorenzi M. Treatment of experimental injury of anal sphincters with primary surgical repair and injection of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Dis Colon Rectum* 2008; 51: 411-420.

32. Aghaee-Afshar M, Rezazadehkermani M, Asadi A, Malekpour-Afshar R, Shahesmaeili A, Nematollahi-mahani SN. Potential of human umbilical cord matrix and rabbit bone marrow-derived mesenchymal stem cells in repair of surgically incised rabbit external anal sphincter. *Dis Colon Rectum* 2009; 52: 1753-1761.

33. Strasser H, Marksteiner R, Margreiter E, Pinggera GM, Mitterberger M, Frauscher F, Ulmer H, Fussenegger M, Kofler K, Bartsch G. Autologous myoblasts and fibroblasts versus collagen for treatment of stress urinary incontinence in women: a randomised controlled trial. *Lancet* 2007; 369: 2179-2186.

34. Kajibafzadeh AM, Elmi A, Payabvash S, Salmasi AH, Saeedi P, Mohamadkhani A, Sadeghi Z, Nikfarjam L.

Transurethral autologous myoblast injection for treatment of urinary incontinence in children with classic bladder exstrophy. *J Urol* 2008; 180: 1098-1105.

35. Frudinger A, Kölle D, Schwaiger W, Pfeifer J, Paede J, Halligan S. Muscle-derived cell injection to treat anal incontinence

due to obstetric trauma: pilot study with 1 year follow-up. *Gut* 2010; 59: 55-61.

36. Tremolada C, G Palmieri and C Ricordi. Adipocyte transplantation

and stem cells: plastic surgery meets regenerative medicine. *Cell Transplant* 2010; 19: 1217-1223.

37. Bianchi F, Maioli M, Leonardi E, Olivi E, Pasquinelli G,

Valente S, Mendez AJ, Ricordi C, Raffaini M, Tremolada C, Ventura C. A new nonenzymatic method and device to obtain a fat tissue derivative highly enriched in pericytelike elements by mild mechanical forces from human lipoaspirates. *Cell Transplant* 2013; 22: 2063-2077.

38. Maioli M, Rinaldi S, Santaniello S, Castagna A, Pigliaru G, Delitala A, et al. Radio electric asymmetric conveyed fields and human adipose-derived stem cells obtained with a non-enzymatic method and device: a novel approach to multipotency. *Cell Transplant* 2013; 22: 1227-1235.

39. Carelli S, Messaggio F, Canazza A, Hebda DM, Caremoli F, Latorre E, Grimoldi MG, Colli M, Bulfamante G, Tremolada

C, Giulio AM, Gorio A. Characteristics and Properties of Mesenchymal Stem Cells Derived from Micro-fragmented

Adipose Tissue. *Cell Transplant* 2014 May 6.

40. Coleman SR. Facial recontouring with liposuction. *Clin Plast Surg* 1997; 24: 347-350.

41. Bernardi C, Favetta U, Pescatori M. Autologous fat injection for treatment of fecal incontinence: manometric and echographic assessment. *Plast Reconstr Surg* 1998; 102: 1626-1628.

42. Nordström RE, Wang J, Fan J. "Spaghetti" fat grafting: a new technique. *Plast Reconstr Surg* 1997; 99: 917-918.

43. Riaz AM, Kwon SY, Stanford WL. Stem cell sources for regenerative medicine. *Methods Mol Biol* 2009; 482: 55-90.

44. Daley GQ, Scadden DT. Prospects for stem cell-based therapy. *Cell* 2008; 132: 544-548.

45. Baglioni S, Francalanci M, Squecco R, Lombardi A, Cantini

G, Angeli R, Gelmini S, Guasti D, Benvenuti S, Annunziato F, Bani D, Liotta F, Francini F, Perigli G, Serio

M, Luconi M. Characterization of human adult stem-cell

populations isolated from visceral and subcutaneous adipose tissue. *FASEB J* 2009; 23: 3494-3505.

46. Fraser JK, Wulur I, Alfonso Z, Hedrick MH. Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology. *Trends Biotechnol* 2006; 24: 150-154.

47. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999; 284: 143-147.

48. Mitchell JB, McIntosh K, Zvonick S, Garrett S, Floyd ZE, Kloster A, Halvorsen Y, Storms RW, Goh B, Kilroy G, Wu X, Gimble JM. Immunophenotype of human adipose derived cells: temporal changes in stromal-associated and stem cell-associated markers. *Stem Cells* 2006; 24: 376-385.

49. DeUgarte DA, Alfonso Z, Zuk PA, Elbarbary A, Zhu M, Ashjian P, Benhaim P, Hedrick MH, Fraser JK. Differential expression of stem cell mobilization-associated molecules on multi-lineage cells from adipose tissue and bone marrow. *Immunol Lett* 2003; 89: 267-270.

50. Marfia G, Campanella R, Navone S, Zucca I, Scotti A, Figini M, Di Vito C, Alessandri G, Riboni L, Parati E. Potential use of human adipose mesenchymal stromal cells for intervertebral disc regeneration: a preliminary study on biglycan-deficient murine model of chronic disc degeneration. *Arthritis Res Ther* 2014; 16: 457.

51. Murphy MB, Moncivais K, Caplan AI. Mesenchymal stem cells: environmentally responsive therapeutics for regenerative medicine. *Exp Mol Med* 2013; 45: e54.

52. Dimarino AM, Caplan AI, Bonfield TL. Mesenchymal stem cells in tissue repair. *Front Immunol* 2013; 4: 201-210.

53. Somoza RA, Welter JF, Correa D, Caplan AI. Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells: challenges and unfulfilled expectations. *Tissue Eng Part B Rev* 2014; 20: 596-608.

Lipogems treatment in anal incontinence 11

54. Kean TJ, Lin P, Caplan AI, Dennis JE. MSCs: Delivery Routes and Engraftment, Cell-Targeting Strategies, and Immune Modulation. *Stem Cells Int* 2013; 2013: 73274.

55. Traktuev DO, Prater DN, Merfeld-Clauss S, Sanjeevaiah AR, Saadatzaheh MR, Murphy M, Johnstone BH, Ingram DA, March KL. Robust functional vascular network formation in vivo by cooperation of adipose progenitor and endothelial cells. *Circ Res* 2009; 104: 1410-1420.

56. Jorge JM, Wexner SD. Etiology and management of fecal incontinence. *Dis Colon Rectum* 1993; 36: 77-97.

57. Rockwood TH, Church JM, Fleshman JW, Kane RL, Mavrantonis C, Thorson AG, Wexner SD, Bliss D, Lowry

AC. Fecal incontinence quality of life scale: Quality of life instrument for patients with fecal incontinence. *Dis Colon Rectum* 2000; 43: 9-17.

58. Murphy MB, Moncivais K, Caplan AI. Mesenchymal stem cells: environmentally responsive therapeutics for regenerative medicine. *Exp Mol Med* 2013; 45: e54.

59. Gruber H, Kovacs P, Piegger J, Brenner E. New, simple, ultrasound-guided infiltration of the pudendal nerve: topographic basics. *Dis Colon Rectum* 2001; 44: 1376-1380.

60. Strasser H, Marksteiner R, Margreiter E, Pinggera GM, Mitterberger M, Fritsch H, Klima G, Rädler C, Stadlbauer KH, Fussenegger M, Hering S, Bartsch G. Stem cell therapy for urinary incontinence. *Urologe A* 2004; 43: 1237-1241.

61. Furuta A, Jankowski RJ, Honda M, Pruchnic R, Yoshimura N, Chancellor MB. State of the art of where we are at using stem cells for stress urinary incontinence. *Neurol Urodyn* 2007; 26: 966-971.

62. Smaledone MC, Chancellor MB. Muscle derived stem cell therapy for stress urinary incontinence. *World J Urol* 2008; 26: 327-332.

63. Nishida S, Endo N, Yamagiwa H, Tanizawa T, Takahashi HE. Number of osteoprogenitor cells in human bone marrow markedly decreases after skeletal maturation. *J Bone Miner Metab* 1999; 17: 171-177.

64. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 2001; 7: 211-228.

65. Costantini M, Cipriani A, Belli P, Bufi E, Fubelli R, Visconti G, Salgarello M, Bonomo L. Radiological findings in mammary autologous fat injections: a multi-technique evaluation. *Clin Radiol* 2013; 68: 27-33.

66. Pienaar WE, McWilliams S, Wilding LJ, Perera IT. The imaging features of MACROLANE™ in breast augmentation. *Clin Radiol* 2011; 66: 977-983.

67. Maeda Y, Laurberg S, Norton C. Perianal injectable bulking agents as treatment for faecal incontinence in adults. *Cochrane Database Syst Rev* 2010; (5): CD007959.

68. Aghaee-Afshar M, Rezazadehkermani M, Asadi A, Malekpour-Afshar R, Shahesmaeili A, Nematollahi-mahani SN. Potential of human umbilical cord matrix and rabbit bone marrow-derived mesenchymal stem cells in repair of surgically incised rabbit external anal sphincter. *Dis Colon Rectum* 2009; 52: 1753-1761.

69. Kajbafzadeh AM, Elmi A, Talab SS, Esfahani SA, Tourchi A. Functional external anal sphincter reconstruction for treatment of anal incontinence using muscle progenitor cell auto grafting. *Dis Colon Rectum* 2010; 53: 1415-1421.

70. Park BW, Kang DH, Kang EJ, Byun JH, Lee JS, Maeng

GH, Rho GJ. Peripheral nerve regeneration using autologous porcine skin-derived mesenchymal stem cells. *J Tissue Eng Regen Med* 2012; 6: 113-124.

71. Hermann A, List C, Habisch HJ, Vukicevic V, Ehrhart-Bornstein M, Brenner R, Bernstein P, Fickert S, Storch A. Age-dependent neuroectodermal differentiation capacity of human mesenchymal stromal cells: limitations for autologous cell replacement strategies. *Cytotherapy* 2010; 12: 17-30.

72. Levy YS, Bahat-Stroomza M, Barzilay R, Burshtein A, Bulvik S, Barhum Y, Panet H, Melamed E, Offen D. Regenerative effect of neural-induced human mesenchymal stromal cells in rat models of Parkinson's disease. *Cytotherapy* 2008; 10: 340-352.

73. Pereira Lopes FR, Frattini F, Marques SA, Almeida FM, de Moura Campos LC, Langone F, Lora S, Borojevic R, Martinez AM. Transplantation of bone-marrow-derived cells into a nerve guide resulted in transdifferentiation into Schwann cells and effective regeneration of transected mouse sciatic nerve. *Micron* 2010; 41: 783-790.

74. Di Summa PG, Kingham PJ, Raffoul W, Wiberg M, Terenghi G, Kalbermatten DF. Adipose-derived stem cells enhance peripheral nerve regeneration. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 2010; 63: 1544-1552.

A. Giori, C. Tremolada, R. Vailati, S.E. Navone, G. 12 Marfia, A.I. Caplan