

Menopausia: nuevas fronteras en el tratamiento de la atrofia urogenital.

G.A. CASAROTTI¹, P. CHIODERA², C. TREMOLADA¹

*Image Institute, Milán, Italia
Departamento de Patología, Synlab, Castenedolo (BS), Italia.*

RESUMEN. –

OBJETIVO: la atrofia urogenital es un proceso degenerativo que puede ocurrir durante la menopausia y causa trastornos debilitantes con sintomatologías dolorosas. La terapia estrogénica retarda el inicio de la atrofia, pero requiere de una terapia continua para mantener su efectividad. Para mitigar las evoluciones degenerativas asociadas con la menopausia, los pacientes pueden beneficiarse de nuevos enfoques terapéuticos, como el uso de células madre mesenquimales. Una de las fuentes es el tejido adiposo el cual es considerado uno de los mayores aciertos, debido a su abundancia y a fácil acceso. Este estudio investiga la viabilidad y los beneficios potenciales de usar un tejido adiposo autólogo para tratar los síntomas de la atrofia urogenital.

PACIENTES Y MÉTODOS:

las primeras tres mujeres afectadas por atrofia urogenital posmenopáusica fueron tratadas en el año 2014, por medio de inyecciones de tejido adiposo autólogo y micro-fragmentado (Lipogems®). Los resultados clínicos se determinaron a los 3, 6, 9, 12, 18, 24 y 36 meses mediante la evaluación de la sequedad vaginal, el ardor, la picazón, la estranguria, la sensibilidad y la dispareunia. Así como también mediante la obtención de biopsias posquirúrgicas y flujo vaginal antes y después de los 36 meses.

RESULTADOS:

A los 6 meses de tratamiento las tres mujeres reportaron una mejora significativa de los síntomas con una resolución completa a los 9 meses. Este beneficio, informado subjetivamente y confirmado por la evaluación clínica, permanece constante y sin recurrencias

al menos hasta los 36 meses. El análisis inmunohistoquímico reveló una recuperación total de la vitalidad vaginal con producción de glucógeno, hiperplasia de la vasculatura y regeneración del epitelio y tejido subcutáneo a los 36 meses. El análisis del flujo vaginal mostró una restauración del pH ácido con la colonización de lactobacilos. No se registraron complicaciones postoperatorias ni eventos adversos.

CONCLUSIONES:

Los resultados de los tres primeros casos apuntaron a que el tejido adiposo autólogo y micro-fragmentado constituye un abordaje terapéutico seguro, factible y efectivo para el tratamiento de la atrofia urogenital posmenopáusica.

Palabras clave: *menopausia, atrofia urogenital, MSC, ASC, tejido adiposo micro-fragmentado, medicina regenerativa, Lipogems®.*

INTRODUCCIÓN

La menopausia constituye una de las etapas de mayor relevancia en la vida de una mujer. Esta se asocia con una marcada reducción en la producción endógena de estrógenos, que induce varios efectos nocivos sobre el sistema urogenital femenino. Mientras que los síntomas vasomotores disminuyen con el tiempo hasta su desaparición, los trastornos del tracto genitourinario, susceptibles a la deficiencia de las hormonas, progresan y empeoran con los años. El epitelio vaginal se atrofia y se seca, causando molestias vaginales, picazón, dispareunia y una reducción en la colonización de los lactobacilos con aumento del pH causado por una

disminución en la producción de ácido láctico; todo esto induce a un desequilibrio de la flora saprofita, con el consiguiente crecimiento de bacterias coliformes que causan inflamación, vaginal, uretral, y las infecciones de la vejiga y el mal olor. La inflamación del epitelio también puede contribuir a los síntomas urinarios, tales como la frecuencia, la urgencia y la incontinencia. La disminución de la producción de estrógenos también afecta la renovación del colágeno, jugando un papel importante en el inicio del prolapso vaginal. Finalmente, en el segmento vejiga-uretral se produce una evolución progresiva hacia la atrofia. Debido al hipoestrogenismo menopáusico, la uretra se encuentra sometida a una disminución de las células intermedias y superficiales y la musculatura del tracto distal, proximal y genitourinario se someten al mismo proceso degenerativo. La reducción en el plexo vascular submucoso y la disminución de la tensión del tejido conectivo disminuyen la presión intramural, favoreciendo el escape de orina.

Debido a que la deficiencia de estrógenos es la causa principal de los cambios urogenitales atróficos, la terapia de estrógenos posmenopáusica es la opción más lógica de tratamiento. La terapia sistémica de estrógenos es el estándar a seguir para ralentizar o bloquear el inicio de la atrofia urogenital, pero requiere una terapia continua para mantener su efectividad. Desafortunadamente, solo el 25% de las mujeres en la menopausia se someten a terapia de reemplazo hormonal (TRH) y/o tópicos estrogénicos, mientras que el 75% restante no se preocupa o utiliza geles, lubricantes y humectantes que proporcionan alivio a corto plazo pero no pueden resolver el problema de la

deficiencia hormonal causando una degeneración tisular constante y continua. La sequedad vaginal, la dispareunia, el dolor, el ardor, la cistitis y la pérdida de orina aumentan con el tiempo y afectan tanto el bienestar mental como el sexual.

Para mitigar los procesos degenerativos asociados con la menopausia y el envejecimiento del tejido vulvovaginal, los pacientes pueden beneficiarse de la medicina regenerativa. Recientemente, las capacidades regenerativas de la grasa con propiedades mesenquimales (ASCII) han sido ampliamente exploradas. A través de acciones tróficas, mitogénicas, anti-cicatrices, anti-apoptótica, inmunomoduladoras, y antimicrobianas, producidas por una gran cantidad de elementos bioactivos, factores de crecimiento y citoquinas. El sentido y la señalización de estas células cambian el microambiente donde residen. El uso de las células ASC, ya sean cultivadas, expandidas u obtenidas por digestión enzimática, han sido objeto de un enorme interés en la medicina regenerativa, tanto en estudios in vitro como in vivo, en los cuales han demostrado su potencial anti-inflamatorio y regenerativo. Empero, la expansión celular y/o la manipulación enzimática tienen complejas restricciones regulatorias. Por ende, la disponibilidad de un tejido graso autólogo mínimamente manipulado rico en estas células regenerativas de origen natural tiene una notable relevancia clínica. En los últimos años se han desarrollado técnicas para cosechar y procesar el tejido adiposo, y los datos publicados muestran tanto la seguridad como la eficacia del uso de la grasa y sus derivados.

Hemos aprovechado una técnica comercialmente disponible que intra-

operativamente proporciona tejido adiposo micro-fragmentado en un corto tiempo, sin expansión y/o tratamiento enzimático. Con la ayuda de esta tecnología, el tejido adiposo se micro-fragmenta y se lava hasta quedar libre de aceite proinflamatorio y residuos de sangre, mientras preserva el nicho vascular estromal intacto. El producto resultante, ha demostrado ser eficaz en el tratamiento de diferentes patologías, proporciona los elementos clave para apoyar una respuesta regenerativa natural: el andamio (la estructura del tejido adiposo), las células (ASC) y los factores de crecimiento (citoquinas secretadas y quimiocinas). Por estas razones, decidimos probar su potencial regenerativo en tres mujeres afectadas por atrofia urogenital posmenopáusica. El consentimiento informado fue obtenido por todos los pacientes.

PRESENTACIÓN DE CASOS

Tres mujeres (edad media 59 años) en etapa menopáusica por más 5 años, presentando atrofia urogenital. Solo una de las pacientes tomaba THS (estriol 0,5 mg /para uso vaginal) desde hacía 6 años. La evaluación clínica basal estándar incluyó la evaluación de los síntomas relacionados con la atrofia urogenital, con particular referencia a la sequedad vaginal, ardor, picazón y estranguria. Para establecer el nivel subjetivo para cada síntoma, se les pidió a las pacientes que clasificaran sus síntomas como leves, moderados o severos. También se evaluó la sensibilidad vaginal y del clítoris para evaluar si estos eran normales, ligeramente reducidos o muy reducidos a lo largo del tiempo. Dado que las tres mujeres eran sexualmente activas, la intensidad de la dispareunia también se registró utilizando la Escala de calificación numérica para el dolor. El sitio del dolor: el monte de Venus, labios

mayores, orificio uretral, prepucio, el clítoris, el frenillo, vestibulum, los labios menores, himen, fosa navicular, y la horquilla- se informó en un mapa topográfico de la zona vulvovaginal.

Se realizó una biopsia en el área vaginal posterior al himen para el análisis inmunohistoquímico y se recogió la secreción vaginal para medir el pH y detectar las características de la flora bacteriana.

Tres de las pacientes eran sintomáticas a todos los síntomas considerados. La sequedad vaginal, que se había originado hacía más de 4 años antes, se presentaba como severa y en aumento, obteniendo pocos o ningún beneficio de los tratamientos tópicos (geles, humectantes, lubricantes). El ardor y la picazón, originados 2 a 3 años antes, se tornaron graves y aumentaban después de la relación sexual. La dispareunia también había aumentando.

En particular, las pacientes experimentaban dolor en el orificio uretral, en el prepucio, el clítoris, el frenillo y la horquilla, y un fuerte dolor en el vestíbulo, los labios menores, el himen y la fosa navicular. Sin dolor en el monte de Venus y los labios mayores. En el informe sobre la reducción de la sensibilidad del clítoris y la vagina se reportó como reducido para una de las pacientes y como muy reducido para dos de las pacientes.

Todas las mujeres acordaron someterse al procedimiento mediante la inyección de tejido adiposo autólogo y micro-fragmentado y firmaron un consentimiento informado. Las pacientes se sometieron al procedimiento de forma ambulatoria bajo una leve sedación y se llevaron a cabo seguimientos a los 3, 6, 9, 12, 18,

24 y 36 meses después del procedimiento.

PACIENTES Y MÉTODOS

Cosecha del tejido adiposo

Para la recolección del tejido adiposo se seleccionó como el sitio donante la parte lateral o inferior del abdomen. Antes de cosechar la grasa, se inyectaron 100 cc de solución de Klein (500 cc de solución salina, 1 cc de epinefrina 1/1000 IU y 40 cc de lidocaína al 2%) en el área periumbilical utilizando una cánula roma 17G desechable conectada a una jeringa de 60 cc luer-lock. La grasa (120 cc) se cosechó utilizando una cánula roma 13G, conectada a una jeringa VacLock® de 20 ml, para una succión rápida y menos traumática.

PROCESAMIENTO DEL TEJIDO ADIPOSO CON DISPOSITIVO LIPOGEMS

La grasa recolectada se procesó de inmediato en el kit de procesamiento Lipogems®, un dispositivo desechable, el cual redujo de manera progresiva el tamaño de los agregados de tejido adiposo, eliminando las sustancias oleosas y los residuos de sangre con propiedades proinflamatorias. Todo el proceso, llevado a cabo en inmersión completa en solución fisiológica minimizando cualquier acción traumática en los productos celulares. El tejido adiposo micro-fragmentado resultante se recolectó en una jeringa de 60 cc, la cual fue posicionada para decantar el exceso de solución salina.

ID Paciente	Edad	Embarazos	VL	Nº of VL	Edad M	HT	TA	Sequedad	Ardor	Comezón	Sens C.	Sens V.	estranguria
1	64	si	Si	2	y.o	Si	Si	Severo	severo	severo	Muy reducida	Muy reducida	severo
2	58	Si	Si	1	52 y.o	no	Si	Severo	Severo	Severa	Muy reducida	Muy reducida	Moderado
3	54	si	Si	1	52 y.o	no	Si	Severo	Severo	Severa	Reducida	Reducida	Ninguno

INYECCIÓN DE TEJIDO ADIPOSO MICRO-FRAGMENTADO.

La grasa micro-fragmentada (15 cc) se inyectó suavemente mediante una cánula roma 20G en pequeñas cantidades en el espacio vaginal subcutáneo y subepitelial de una manera homogénea y uniforme siguiendo el mapa topográfico que indicaba el dolor y los sitios sensibles. Además, debido a que dos pacientes sufrían de estranguria, con pérdida de orina al toser, también se inyectaron las áreas parauretrales alrededor de 3 cm a lo largo de la uretra. El tiempo quirúrgico total, desde la lipoaspiración hasta la inyección fue de aproximadamente 1 hora. Las pacientes fueron dadas de alta con la prescripción de lavado íntimo medicado, antibiótico durante 3 días (azitromicina 500 mg /), y la recomendación de que debían abstenerse de mantener relaciones sexuales durante las primeras 4 semanas.

ANÁLISIS INMUNOHISTOQUÍMICO

Las biopsias se recogieron 15 días antes del procedimiento y 36 meses después de la operación. El tejido se fijó en formalina al 10% y se procesó para la evaluación histopatológica de rutina, se seccionó hasta un grosor de 4 µm y se tiñó con hematoxilina y eosina (mediana de 10 portaobjetos por caso). Los estudios de inmunoperoxidasa se realizaron en secciones de tejido embebidas en parafina y fijadas en formalina de 5 µm de espesor. Se colocaron secciones de tejido en Ventana Bench-Mark XT (Ventana Medical Systems, Inc., Oro Valley, AZ, EE. UU.) Para tinción. El protocolo de tinción incluyó la desparafinación, la

recuperación del epítipo inducido por calor con Ventana Cell Conditioning 1 (CC1) seguido de incubación en anticuerpo primario a 37 ° C durante 32 minutos. Las reacciones antígeno-anticuerpo se visualizaron usando el kit de detección Ultra-View Universal DAB de Ventana (Ventana Medical Systems, Inc.). Uso de Ventana BenchMarkXT usando Ventana Haematoxylin II durante 8 min, seguido de reactivo azul durante 4 minutos.

Las fuentes y condiciones de anticuerpos inmunohistoquímicos: anti-CD34 (QEnd-10; Dako, Carpinteria, CA, EE. UU.); clon anti-Desmina DE-U-10 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.); Anticuerpo monoclonal, clon del músculo α -Smooth 1A4 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.); El clon L26 / 1R604 de CD20cy antihumano de ratón monoclonal (Dako, Glostrup, Dinamarca); El clon IR503 de CD3 antihumano de conejo policlonal (Dako, Glostrup, Dinamarca); Antígeno Ki-67 de ratón monoclonal antihumano, clon MIB / IR626 (Dako, Glostrup, Dinamarca).

PRUEBAS DE DESCARGA VAGINAL

Examen fisicoquímico y microscópico del pH de la descarga vaginal y determinar la característica de la flora bacteriana.

RESULTADOS

No ocurrieron complicaciones intra y postoperatorias. Tres meses después del procedimiento, la sequedad vaginal, la picazón y el ardor disminuyeron de severos a moderados en todas las pacientes, y a los 6 meses una de las pacientes informó que la disminución fue leve. A los 9 meses, los síntomas

desaparecieron en las tres mujeres y esta condición de bienestar se mantuvo estable hasta los 36 meses. Solo la mujer de 64 años presentó una leve quemadura ocurrido después del coito ocasional. La sensibilidad vaginal y clitoriana, fue muy reducida en 2 de las pacientes y reducida en la otra, mejoró a los 3 meses, volviendo a la condición normal a los 6 meses, permaneciendo estable hasta los 36 meses. En uno de los casos, la sensibilidad vaginal y clitoriana regresó normal 4 meses después del procedimiento. La paciente informó que era incluso mayor de lo que experimentó antes de la menopausia (Tabla II). La dispareunia se evaluó mediante examen clínico de los sitios vulvovaginales. Tres meses después del procedimiento, el dolor disminuyó significativamente de fuerte a moderado o de moderado a leve. Curiosamente, entre los 6 y 9 meses, las dos mujeres más jóvenes no percibieron dolor en ninguno de los sitios evaluados, mientras que la mujer de 64 años informó sentir un leve y persistente dolor (puntuación NRS 1-2) en la fosa navicular y la horquilla (Figura 1).

La estranguria, informada por dos mujeres, desapareció entre los 6 y 9 meses, mientras que la pérdida de orina cesó a partir de los 3 meses (Tabla II). A partir del sexto mes, también el aspecto estético se benefició del tratamiento, los genitales externos tenían un mejor aspecto como en el período fértil, y la mucosa vaginal de color pálido a rosado. A los 36 meses el examen histológico reveló una recuperación total de la vitalidad vaginal con la producción de glucógeno, hiperplasia de la vasculatura y regeneración del epitelio y del tejido subcutáneo en todas las pacientes. No se observaron daños en el epitelio escamoso vaginal, con un grosor celular regular compuesto de células de

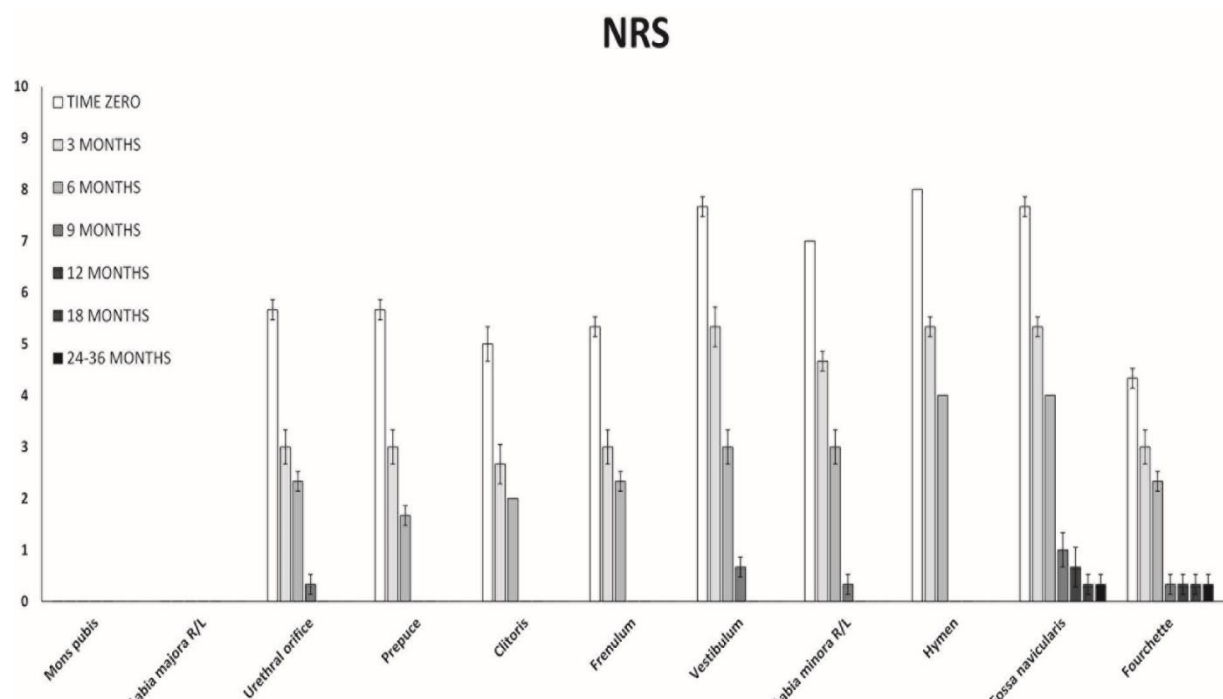


Figura 1. Intensidad de la dispareunia informada con la Escala de valoración numérica (NRS) para el dolor (0-10) desde el inicio hasta 36 meses de seguimiento. Los resultados se expresan como media y error estándar.

Supplementary table II. Summary of the results.

ID patient	follow up time	dryness	burning	itching	sensitivity clitoris	sensitivity vagina	stranguria
01	Baseline	severe	severe	severe	very reduced	very reduced	severe
02		severe	severe	severe	very reduced	very reduced	moderate
03		severe	severe	severe	reduced	reduced	none
01	3 months	moderate	moderate	moderate	reduced	reduced	moderate
02		moderate	moderate	moderate	reduced	reduced	none
03		moderate	moderate	moderate	normal	normal	none
01	6 months	moderate	moderate	moderate	normal	normal	mild
02		moderate	moderate	mild	normal	normal	none
03		mild	mild	absent	normal	normal	none
01	9 months	mild	mild	mild	normal	normal	none
02		mild	absent	absent	normal	normal	none
03		absent	absent	absent	normal	normal	none
01	12 months	absent	absent	absent	normal	normal	none
02		absent	absent	absent	normal	normal	none
03		absent	absent	absent	normal	normal	none
01	18 months	absent	absent	absent	normal	normal	none
02		absent	absent	absent	normal	normal	none
03		absent	absent	absent	normal	normal	none
01	24 months	absent	mild	absent	normal	normal	none
02		absent	absent	absent	normal	normal	none
03		absent	absent	absent	normal	normal	none
01	36 months	absent	mild	absent	normal	normal	none
02		absent	absent	absent	normal	normal	none
03		absent	absent	absent	normal	normal	none

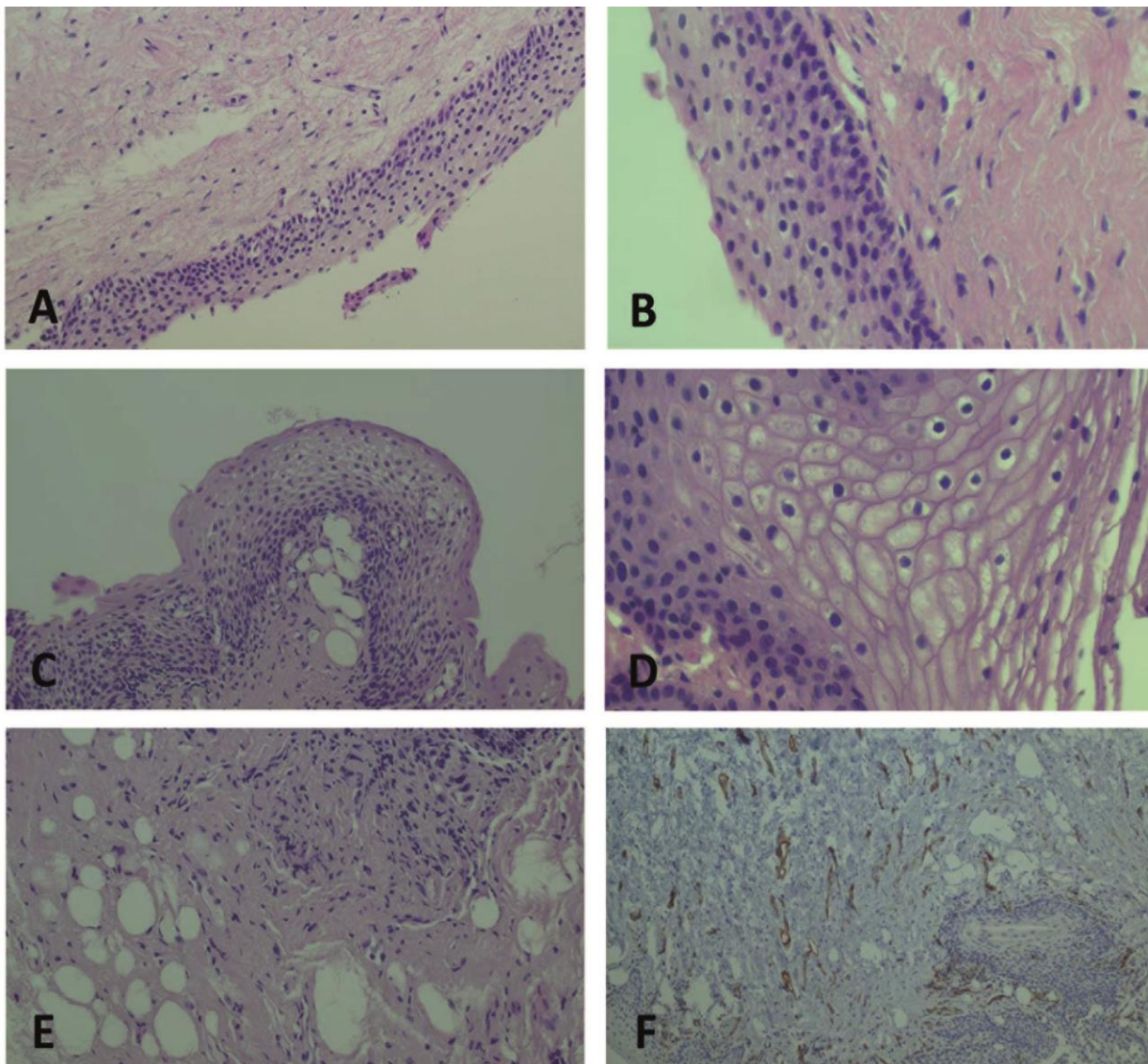


Figura 2. Evaluaciones inmunohistoquímicas del paciente 2. A-B, preoperatorio. C-F, 36 meses después de la operación histología. A, epitelio escamoso vaginal aplanado con una reducción notable del estrato córneo. B, Detalle de la imagen A que muestra una reducción considerable en el espesor del epitelio escamoso vaginal a nivel del Malpighian con marcada hipoglicogénesis superficial. C, epitelio normotrófico escamoso vaginal de grosor celular regular, compuesto de células de Malpighian claras e hiperglicógenas, con una capa basal regular. D, detalle del epitelio escamoso con una capa de Malpighian y superficial de células hiperglicogénicas. E, tejido adiposo inusual compuesto de adipocitos asimétricos medianos y grandes en corion edematoso. F,

Malpighian claras e hiperglicógenas y una capa basal regular (Figura 2) El análisis del flujo vaginal mostró la restauración del pH del ácido fisiológico (rango 4.04.2 comparado con 6.0-6.2 preoperatorio) con una colonización de lactobacilos similar a la de la edad fértil en las tres mujeres (datos no mostrados).

ANALISIS

La atrofia genitourinaria, es una alteración de los tejidos del aparato genital y de la uretra que ocurre durante la menopausia cuando cesa la producción de hormonas esteroides ováricas. La deficiencia de estrógenos

induce cambios morfológicos y estructurales en la vagina, la vulva y la uretra, provocando sequedad vaginal, prurito, ardor, dispareunia, estranguria, disminución de la sensibilidad y pérdida de orina. Estos trastornos surgen de manera con el final de la edad fértil, con una variabilidad subjetiva. Aunque no son incapacitantes, estos síntomas son ciertamente capaces de dañar el bienestar físico y mental, reduciendo la confianza de las mujeres y socavando su vida sentimental.

La terapia de reemplazo hormonal es el único tratamiento farmacológico capaz de bloquear y ralentizar este proceso degenerativo, pero requiere una terapia continua para mantener su efectividad.

Nuestra hipótesis de que la atrofia genitourinaria puede ser contrarrestada por la medicina regenerativa ha sido confirmada, más allá de las expectativas hipotéticas, en nuestros tres primeros casos tratados con inyección de tejido adiposo autólogo y micro-fragmentado. La técnica innovadora que utilizamos intraoperatoriamente proporciona tejido adiposo micro-fragmentado en poco tiempo, sin expansión ni tratamiento enzimático. El tejido adiposo se microfragmenta y se lava hasta que quede libre de aceite y restos de sangre proinflamatorios, a la vez que se conservan elementos viables con identidad de pericitos dentro de un nicho vascular estromal intacto.

La integridad del nicho implica la liberación de factores regenerativos y moléculas bioactivas (inmunomoduladoras, anti cicatriz, antiapoptóticas, angiogénicas, mitóticas y antimicrobianas), que hacen que el tejido trasplantado actúe como un "medio de liberación oportuno" de tales elementos en el sitio de inyección. La principal

unidad adiposa estructural y morfológica, el nicho adiposo, se mantiene después del procesamiento, protege las ASC activadas, fortalece su efectividad en el entorno receptor y se comporta como una herramienta a gran escala para suministrar tejido dañado con un entorno regenerativo.

6 meses después del tratamiento, las tres mujeres informaron mejoras significativas y una resolución completa de sus síntomas a los 9 meses, sin complicaciones o eventos adversos. Este beneficio, informado subjetivamente y confirmado por la evaluación clínica, se mantuvo constante sin recurrencia al menos hasta el seguimiento de 36 meses. Cabe destacar que el tratamiento no se repitió y no se requirió terapia hormonal adyuvante tópica. A los 36 meses el examen histológico reveló una recuperación total de la vitalidad vaginal con producción de glucógeno, hiperplasia de la vasculatura y regeneración del epitelio y tejido subcutáneo en todas las pacientes.

CONCLUSION

Los resultados de estos tres primeros casos muestran la seguridad, la viabilidad y la eficacia del uso de la inyección autóloga de tejido adiposo micro-fragmentado y mínimamente manipulada para el tratamiento de la atrofia urogenital. El procedimiento es simple, sostenible, rápido, mínimamente invasivo, de un solo paso y seguro. Después de 36 meses, los resultados son muy satisfactorios y prometedores. Se está llevando a cabo un estudio similar en 16 mujeres y, si se confirman los resultados, este enfoque abrirá las puertas a una terapia alternativa segura, viable y efectiva para el tratamiento de la atrofia genitourinaria posmenopáusica.

CONFLICTO DE INTERESES.

G. A. Casarotti y P. Chiodera declaran no tener intereses en conflicto. C. Tremolada es fundador y presidente de Lipogems International Spa e inventor del sistema Lipogems®.

Referencias. -

- 1) Semmens JP, Wagner g. Estrogen deprivation and vaginal function in postmenopausal women. *Jama* 1982; 248: 445-448.
- 2) Bachmann ga, nevadunsky nS. Diagnosis and treatment of atrophic vaginitis. *American family physician* 2000; 61: 3090-3096.
- 3) heinemann c, reid g. Vaginal microbial diversity among postmenopausal women with and without hormone replacement therapy. *Can J Microbiol* 2005; 51: 777-781.
- 4) PaBich WL, Fihn Sd, Stamm We, SchoLeS d, Boyko eJ, guPta k. Prevalence and determinants of vaginal flora alterations in postmenopausal women. *J Infect Dis* 2003; 188: 1054-1058.
- 5) CaiLLouette Jc, SharP cF, Zimmerman gJ, roy S. Vaginal pH as a marker for bacterial pathogens and menopausal status. *Am J Obstet Gynecol* 1997; 176: 1270-1277; discussion 1275-1277.
- 6) Pandit L, ouSLander Jg. Postmenopausal vaginal atrophy and atrophic vaginitis. *Am J Med Sci* 1997; 314: 228-231.
- 7) moaLLi Pa, taLarico LC, Sung vW, kLingenSmith WL, Shand Sh, meyn La, WatkinS Sc. Impact of menopause on collagen subtypes in the arcus tendineous fasciae pelvis. *Am J Obstet Gynecol* 2004; 190: 620-627.
- 8) tineLLi a, maLvaSi a, Rahimi S, Negro r, Vergara d, Martignago r, PeLLegrino m, CavaLLotti c. Age-related pelvic floor modifications and prolapse risk factors in postmenopausal women. *Menopause* 2010; 17: 204-212.
- 9) Bergman a, karram mm, Bhatia nn. Changes in urethral cytology following estrogen administration. *Gynecol Obstet Invest* 1990; 29: 211-213. 10) SemmeLink h, de WiLde P, van houWeLingen J, vooiJS gP. Histomorphometric study of the lower urogenital tract in pre-and post-menopausal women. *Cytometry* 1990; 11: 700-707.
- 11) JackSon S, JameS m, aBramS P. The effect of oestradiol on vaginal collagen metabolism in postmenopausal women with genuine stress incontinence. *BJOG* 2002; 109: 339-344.
- 12) roBinSon d, Cardozo L. Urogenital effects of hormone therapy. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2003; 17: 91-104.
- 13) naPpi re, niJLand ea. Women's perception of sexuality around the menopause: outcomes of a European telephone survey. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2008; 137: 10-16.
- 14) giuSePPina OneSti m, CareLLa S, CeccareLLi S, marcheSe c, Scuderi n. The use of human adipose-derived stem cells in the treatment of physiological and pathological vulvar dystrophies. *Stem Cells Int* 2016; 2016: 2561461.
- 15) gimBLE Jm, guiLak F, BunneLL Ba. Clinical and preclinical translation of cell-based therapies using adipose tissue-derived cells. *Stem Cell Res Ther* 2010; 1: 19.
- 16) Zuk Pa, Zhu m, aShJian P, de ugarte da, huang Ji, miZuno h, aLFonSo Zc, FraSer Jk, Benhaim P, hedrick mh. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* 2002; 13: 4279-4295. 17) 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.
- 18) CaPLan ai, Correa d. The MSC: an injury drugstore. *Cell Stem Cell* 2011; 9: 11-15.
- 19) CaPLan ai, dennis Je. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J Cell Biochem* 2006; 98: 10761084.
- 20) ChamBerLain g, Fox J, aShTon B, middLeton J. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells* 2007; 25: 2739-2749.
- 21) ÄhrLund-Richter L, de Luca m, marShak dr, munSie m, Veiga a, rao m. Isolation and production of cells suitable for human therapy: challenges ahead. *Cell Stem Cell* 2009; 4: 20-26.
- 22) arcidiacono Ja, BLair JW, Benton ka. US Food and Drug Administration international collaborations for cellular therapy product regulation. *Stem Cell Res Ther* 2012; 3: 38.
- 23) SenSeBé L, Bourin P, tarte k. Good manufacturing practices production of mesenchymal stem/stromal cells. *Hum Gene Ther* 2010; 22: 19-26. 24) oBerBauer e, SteFFenhagen c, WurZer c, gaBrieL c, redL h, WoLBank S. Enzymatic and non-enzymatic isolation systems for adipose tissue-derived cells: current state of the art. *Cell Regen (Lond)* 2015; 4: 7.
- 25) raPoSio e, BertoZZi n. How to isolate a ready-to-use adipose-derived stem cells pellet for clinical application. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2017; 21: 4252-4260.
- 26) gutoWSki ka, Force aFgt. Current applications and safety of autologous fat grafts: a report of the ASPS fat graft task force. *Plast Reconstr Surg* 2009; 124: 272-280.

- 27) **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 pericyte-like elements by mild mechanical forces from human lipoaspirates. *Cell Transplant* 2013; 22: 2063-2077.
- 28) **BenZi r, marFia g, BoSetti m, BeLtrami g, magri aS, VerSari S, tremoLada c.** Microfractured lipoaspirate may help oral bone and soft tissue regeneration: a case report. *CellR4* 2015; 3: e1583.
- 29) **CeStaro g, de roSa m, maSSa S, amato B, gentiLe m.** Intersphincteric anal lipofilling with micro-fragmented fat tissue for the treatment of faecal incontinence: preliminary results of three patients. *Wideochir Inne Tech Maloinwazyjne* 2015; 10: 337-341.
- 30) **FranceSchini m, CaSteLLaneta c, mineo g.** Injection of autologous micro-fragmented adipose tissue for the treatment of post-traumatic degenerative lesion of knee cartilage: a case report. *CellR4* 2016; 4 e1768. 31) **giori a, tremoLada c, VaiLati r, Navone Se, marFia g, CaPLan ai.** Recovery of function in anal incontinence after micro-fragmented fat graft (Lipogems®) injection: two years follow up of the first 5 cases. *CellR4* 2015; 3: e1544.
- 32) **groSSi P, giarratana S, Cernei S, groSSi S, doniSeLLi Fm.** Low back pain treated with disc decompression and autologous micro-fragmented adipose tissue: a case report. *CellR4* 2016; 4: e1772.
- 33) **raFFaini m, tremoLada c.** Micro fractured and purified adipose tissue graft (Lipogems®) can improve the orthognathic surgery outcomes both aesthetically and in postoperative healing. *CellR4* 2014; 2: e1118.
- 34) **SaiBene a, PiPoLo c, LoruSSo r, PortaLeone Sm, FeLiSati g.** Transnasal endoscopic microfractured fat injection in glottic insufficiency. *B-ENT* 2014; 11: 229-234. 35) **Striano r, Chen h, BiLBooL n, aZatuLLah k, hiLado J, horan k.** Case Study: Non-responsive knee pain with osteoarthritis and concurrent meniscal disease treated with autologous microfragmented adipose tissue under continuous ultrasound guidance. *CellR4* 2015; 3: e1690.
- 36) **Bianchi F, oLivi e, BaLdaSSarre m, giannone Fa, Laggetta m, VaLente S, CavaLLini c, taSSinari r, Canaider S, PaSquineLLi g, tremoLada c, Ventura c.** Lipogems, a new modality of fat tissue handling to enhance tissue repair in chronic hind limb ischemia. *CellR4* 2014; 2: e1289.
- 37) **tremoLada c, CoLomBo V, Ventura c.** Adipose tissue and mesenchymal stem cells: state of the art and Lipogems® technology development. *Curr Stem Cell Rep* 2016; 2: 304-312.