

Associação de células-tronco derivadas de tecido adiposo de diferentes espécies animais a biomaterias

Luiz Irineu Deimling¹

¹ IRD/CNEN.

E-mail: irineu@bolsista.ird.gov.br; deimling.li@gmail.com

Resumo: A engenharia de tecidos desponta como uma estratégia promissora à regeneração de tecidos danificados, especialmente quando associa de células-tronco a biomateriais. O objetivo deste trabalho foi investigar os parâmetros de aderência e de proliferação de células-tronco derivadas de tecido adiposo (CTAD) humanas, caninas e murinas associadas a matrizes de biomateriais (BD Biosciences). Os resultados mostram que as CTAD aderem preferencialmente aos biomateriais não submetidos à pré-incubação. As CTAD humanas apresentaram índice de proliferação mais elevado quando cultivadas em condições convencionais de cultivo, enquanto as CTAD caninas e murinas o fizeram preferencialmente quando associadas a biomateriais. Estes resultados indicam a possibilidade da associação de CTAD a biomateriais e a sua utilização em aplicações clínicas.

Palavras-chave: CTAD, biomateriais, colágeno, OPLA, fosfato de cálcio.

Abstract: Tissue engineering has emerged as a promising strategy for regeneration of damaged tissues, especially when stem cells are associated to biomaterials. The present study aimed to investigate the patterns of adhesion and proliferation of human, canine and murine adipose-derived stem cells (ADSC) after association with different biomaterials (BD Biosciences). The results show that ADSC adhere more to scaffolds not submitted to pre-incubation. Human ADSC showed higher proliferation index in conventional conditions than in association with biomaterials, contrary to canine and murine ADSC. These results indicate that the association of ADSC to biomaterials is feasible and may be exploited for clinical applications.

Keywords: ADSC, biomaterials, collagen, OPLA, calcium phosphate.

1. INTRODUÇÃO

Um variado painel de *scaffolds* biodegradáveis está disponível como substitutos artificiais para a matriz extracelular. Entre eles, os biomateriais constituídos de biomoléculas como o colágeno e poli (L-ácido láctico) (OPLA) e biocerâmicas como fosfato de cálcio (figura 1). Como vantagem em relação aos sistemas convencionais de cultura de células na forma

bidimensional (cultivos 2D), os *scaffolds* fornecem um substrato adesivo que também serve como uma matriz de suporte físico para as células *in vitro* (cultivos 3D), especialmente as células-tronco.

Operacionalmente, as células-tronco (CT) são caracterizadas como células capazes de se multiplicar por longos períodos, mantendo-se indiferenciadas, e capazes ainda de diferenciação,

especializando-se em um tecido particular (Nardi e Meirelles, 2006; Csaki et al, 2007; www.adistem.com/idiopathic-pulmonary-fibrosis.html, 2011).

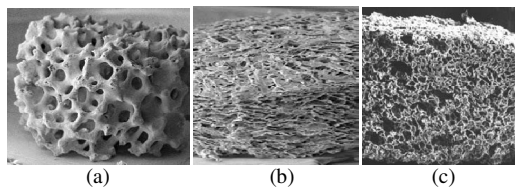


Figura 1. *Scaffolds* de OPLA (a), colágeno (b) e fosfato de cálcio (c).

As CT, descritas inicialmente a partir das células progenitoras do sangue, são encontradas virtualmente em todos os tecidos adultos (Nardi, 2005; Meirelles et al, 2006; Meirelles et al, 2008, 2009; Orbay et al, 2012).

1.1. Células-tronco mesenquimais (CTM)

Identificadas por Friedenstein et al, em 1966 (referido por Afanasyev et al, 2009), a partir das células mononucleares da medula óssea de camundongos, estas células foram originalmente denominadas células formadoras de colônias fibroblásticas (*colony forming units-fibroblastic, CFU-F*). Recentemente elas passaram a ser denominadas células-tronco mesenquimais (CTM). A partir de 2006, a Sociedade Internacional para Terapia Celular propôs um conjunto de critérios para definir as CTM humanas (Horwitz et al, 2005; Dominici et al, 2006). Dentre os critérios, os marcadores de superfície ainda suscitam divergências (Meirelles e Nardi, 2009), parcialmente explicadas pela variação nos métodos de cultura e/ou pelo estágio de diferenciação das células (Meirelles et al, 2006; Boxall e Jones, 2012). Outro critério adotado baseia-se na capacidade de diferenciação *in vitro* das CTM em tecidos ósseo, adiposo e cartilaginoso (Pratheesh et al, 2011).

1.2. Células-tronco derivadas de tecido adiposo (CTAD)

As células-tronco adiposo-derivadas (CTAD), uma população de CTM (Zuk et al, 2001; Bunnell et al, 2008; Hernández et al, 2008; Arrigoni et al, 2009; Golipoor et al, 2010; Zuk, 2010; Witkowska-Zimny e Walenko, 2011; www.adistem.com/idiopathic-pulmonary-fibrosis.html, 2011), é isolada a partir da fração

estromal-vascular do tecido adiposo (Colleoni et al, 2009; Meirelles e Nardi, 2009; Sorrell et al, 2011). Todavia, enquanto as CTAD humanas e murinas já estão relativamente bem descritas, a biologia destas células em outras espécies ainda é pouco conhecida (Zuk et al, 2002; Strem et al, 2005), limitando a sua difusão para outras aplicações (Taylor et al, 2007; Spencer et al, 2012).

As características das CTAD fazem com que sejam empregadas, notadamente, na área da medicina regenerativa (Caplan, 2009; Pawitan, 2009). Representam uma estratégia alternativa ao tratamento de várias patologias em humanos (Giordano et al, 2007; Daley e Scadden, 2008), na medicina veterinária (Black et al, 2007, 2008; Dahlgren, 2006; Nathan et al, 2003) e na terapia celular e engenharia de tecidos (Tapp et al, 2009; Raabe et al, 2011; Russo e Parola, 2011; Strem et al, 2005).

1.3 Cultivo tridimensional de CTAD

A engenharia de tecidos, uma abordagem da medicina regenerativa, constitui-se como uma estratégia que combina o cultivo celular convencional bidimensional (2D) e o uso de biomateriais (Orsi et al, 2007; Willerth e Sakiyama-Elbert, 2008; Wu et al, 2011). As características mais observadas nos biomateriais são as propriedades que mimetizam os componentes do tecido nativo a ser regenerado (Hee et al., 2006). Neste intento, utilizam-se comumente cerâmicas de fosfato de cálcio, polímeros (alfa-hidroxi ácidos) e colágeno.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Todos os procedimentos foram guiados pelos protocolos de pesquisa animal conforme estabelecido pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA). O presente projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Luterana do Brasil (23/11/2010, nº 2010-1). O material humano foi coletado após aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, e após assinatura de termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) dos pacientes.

A morfologia das culturas foi analisada por exame periódico em microscópio invertido com contraste de fase (Axiovert 25, Carl Zeiss) e a cinética do cultivo acompanhada por contagem das células plaqueadas e recuperadas em cada passagem. As células utilizadas nos experimentos foram mantidas em cultura, expandidas e caracterizadas entre as passagens 7-10. As análises do potencial de diferenciação foram realizadas de acordo com protocolos descritos (Meirelles et al, 2006; Nardi e Meirelles, 2006). Estes dados não foram apresentados por não contribuírem com o propósito do presente estudo.

Após as primeiras passagens, entre a 4^a e 7^a, as células derivadas da fração estromal do tecido adiposo foram associadas a *scaffolds* de OPLA, colágeno e fosfato de cálcio (cultivos 3D) (BD Biosciences). As variáveis testadas para a padronização do cultivo das CTAD foram: a pré-incubação (PC, *pre-coating*) ou não (D, *dry*) do *scaffold* em meio contendo soro fetal bovino; e diferentes concentrações celulares (10^4 e 5×10^4 células/*scaffold*). As células foram incubadas com o biomaterial em placas de cultivo de 24 poços, durante 3 h, a 37 °C em atmosfera com 5% de CO₂. Após este período, a cada poço foram adicionados 250 µL de HDMEM e o biomaterial foi agitado para desprendimento das células não aderidas e transferido para um novo poço, contendo 250 µL de HDMEM suplementado com 10% de SFB, para posterior cultivo 37 °C em atmosfera com 5% de CO₂.

Para a avaliação da aderência celular, foram feitas contagens de células não aderidas aos *scaffolds*, para cada um dos três biomateriais, a partir de preparações coradas com GIEMSA. Para a análise estatística, todavia, consideraram-se a porcentagem (%) de células aderidas aos biomateriais. A contagem das células foi conduzida em microscópio óptico invertido sob aumento de 200X. A taxa de aderência assim obtida foi posteriormente utilizada para o cálculo das concentrações celulares incubadas nos cultivos 2D para avaliação da proliferação celular.

As análises de proliferação celular foram realizadas através do teste MTT (de acordo com a ISO 10993-5, 2009) a partir de CTAD cultivadas por três dias em associação com os biomateriais.

O ensaio MTT avalia a atividade metabólica das células, quantificando a redução metabólica do MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) por desidrogenases associadas ao NADPH e ao NADH, do que resulta a produção de cristais de formazan, intensamente coloridos, no interior das células (Mosmann, 1983). Alíquotas de 100 µL desta solução foram pipetadas em placas de 96 poços. Os dados de densidade óptica (O.D.) foram obtidos a partir de leitura em espectrofotômetro de placas, com comprimento de ondas de 540 nm.

Para a realização destes ensaios foram plaqueadas 10^4 e 5×10^4 células/*scaffold*, em placas de 24 poços, utilizando-se triplicatas para cada concentração de células.

A análise estatística testou o ajustamento das distribuições das variáveis em relação à distribuição normal ($p < 0,05$). Foram descritas as variáveis quantitativas pela média e desvio padrão quando a distribuição era simétrica e mediana e amplitude interquartil quando assimétricas. As variáveis categóricas foram descritas por frequências absolutas e frequências relativas percentuais. As variáveis quantitativas com distribuição simétrica foram comparadas entre os grupos pelo teste ANOVA, seguida de Tukey, para comparações múltiplas, e pelo teste Kruskal-Wallis quando a distribuição era assimétrica. Foi considerado um nível de significância de 5% ($p < 0,05$). Para as análises foi utilizado o pacote estatístico SPSS v.14.0.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A otimização de parâmetros relativos aos procedimentos utilizados nos experimentos fizeram parte da metodologia do estudo. O rendimento do isolamento das CTAD oscilou entre 2 e 10×10^5 células/mL de tecido. Essas células - CTAD humanas (hCTAD), caninas (cCTAD) e murinas (mCTAD) - originaram cultivos celulares com a morfologia típica das CTM (Meirelles e Nardi, 2009). Além da alta taxa de proliferação observada (Payushina et al, 2006; Yoshimura et al, 2007), as culturas de CTAD foram capazes de diferenciar nas linhagens adipogênica, condrogênica e osteogênica (Dicker et al, 2005; Sakaguchi et al, 2005; Dominici et al, 2006; Vater et al, 2011;

Gaiba et al, 2012) e expressar um conjunto característico de marcadores de superfície (Shi et al, 2001; Sharifi et al, 2012).

A associação das CTAD aos biomateriais é uma medida da função de fatores exercidos pela natureza da interface célula-matriz e as condições de pré-tratamento da superfície com quais as células interagem (Nuffer et al, 2010; Tour et al, 2011). As propriedades da superfície sobre a qual as células são cultivadas parecem desempenhar papel importante não só na adsorção de proteínas, mas também no potencial de diferenciação de CTM humanas (Curran et al, 2006). Além disso, estímulos externos, tal como a mecânica do ambiente, podem intervir ou até mesmo se sobrepor aos sinais presentes na cultura (Thorpe et al, 2012). Estas observações reportam aspectos relevantes constantes nos estudos de cultivos celulares tridimensionais.

Todas as CTAD demonstraram boa capacidade de adesão aos biomateriais testados. Após 3 horas de incubação, em média, 81,3% das células permaneciam aderidas à matriz (figura 2).

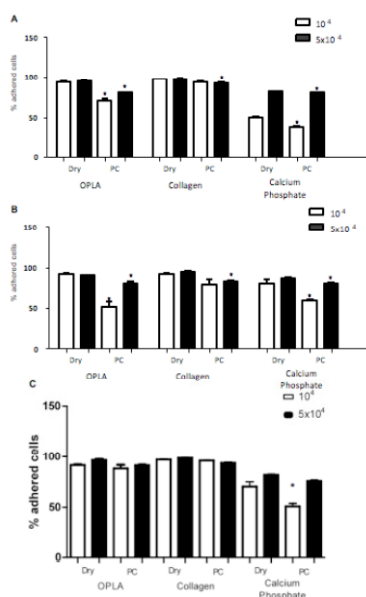


Figura 2. A adesão de hCTAD (A), cCTAD (B) e mCTAD (C) em cada um dos três biomateriais, nas condições de semeadura celular D e PC e nas duas concentrações de células testadas. O asterisco (*) nas colunas indica uma diferença estatisticamente significativa (redução) no percentual das células aderentes a biomateriais entre as amostras com a mesma concentração celular.

Na associação das CTAD com os biomateriais, na maior concentração avaliada

(5x10⁴ células/matriz), a aderência foi, em termos gerais, maior (88%, 87% e 92%, respectivamente para hCTAD, cCTAD e mCTAD) do que quando comparada à menor concentração testada, 10⁴ células/matriz (74%, 77% e 82%, respectivamente). De modo geral, a pré-incubação das matrizes (PC) reduz a capacidade de aderência das CTAD ao biomaterial, em relação à condição de associação a seco (D). Todavia, a associação de cCTAD e hCTAD, na menor concentração testada (10⁴ células/matriz), com o colágeno não mostrou diferenças estatisticamente significativas quanto a esta condição de pré-tratamento do biomaterial.

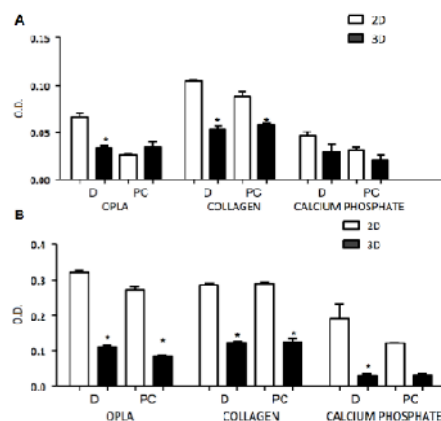


Figura 3. Proliferação de hCTAD em culturas 2D e 3D após as condições de semeadura D ou PC, nas concentrações de 10⁴ (A) ou 5x10⁴ (B) células/scaffold.

Na avaliação da proliferação celular, comparamos CTAD, da mesma espécie, associadas aos biomateriais (3D) e CTAD cultivadas em condições convencionais de cultura (2D), semeadas na mesma concentração. Para células humanas, em ambas as concentrações, o índice de proliferação celular foi menor quando as hCTAD eram associadas aos biomateriais (condição 3D) do que quando cultivadas em condições convencionais (2D) (figura 3). Via de regra, as diferenças observadas são estatisticamente significativas, à exceção das hCTAD na menor concentração (10⁴ células/matriz) associadas ao OPLA, após pré-incubação. Estas diferenças são mais evidentes quando as condições de cultivo (2D x 3D) são comparadas na maior concentração celular (5x10⁴ células/matriz) (figura 3B).

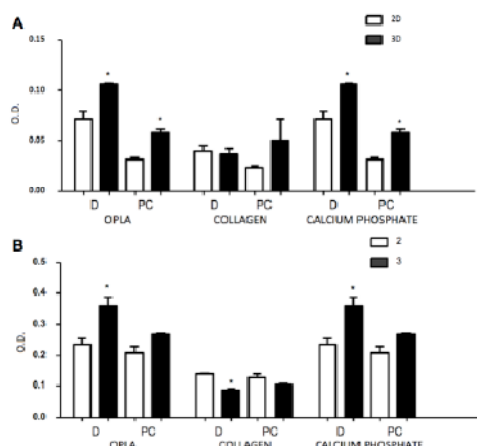


Figura 4. Proliferação de cCTAD em culturas 2D e 3D após a semeadura D ou PC, nas concentrações celulares de 10^4 (A) ou 5×10^4 (B) células/matriz.

As CTAD caninas associadas ao OPLA e ao fosfato de cálcio demonstraram maior índice proliferativo do que aquelas cultivadas em sistemas convencionais (2D) (figura 4). Estas diferenças são estatisticamente significativas para ambas as concentrações de semeadura inicial (10^4 e 5×10^4 células/matriz). As cCTAD cultivadas sobre matrizes de colágeno mostraram um comportamento oposto: o índice de proliferação das células na condição 3D foi menor do que aquele avaliado na condição 2D.

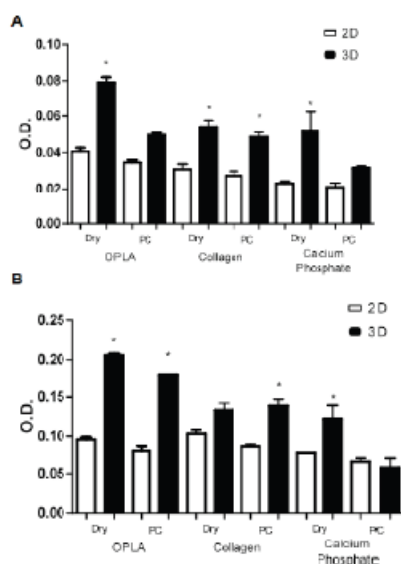


Figura 5. Proliferação de mCTAD em culturas 2D e 3D após a semeadura D ou PC, nas concentrações de células 10^4 (A) ou 5×10^4 (B) células/matriz.

A taxa de proliferação de CTAD murinas demonstrou ser maior quando as células são

associadas aos biomateriais (3D) do que quando cultivadas de acordo com o sistema convencional (2D). A diferença é estatisticamente significativa para ambas as concentrações. Esta diferença é visivelmente maior quando compara mCTAD semeadas sobre matrizes (3D) secas (D) e células mantidas em cultivos 2D (figura 5).

4. CONCLUSÕES

Os resultados do presente estudo contribuem para o aporte de dados à engenharia de tecidos. Eles mostram que as CTAD das três espécies investigadas, quando adequadamente isoladas e expandidas, são capazes de adesão e de proliferação quando associadas a biomateriais à base de colágeno, de fosfato de cálcio e OPLA. Desta forma, podem contribuir como importante ferramenta para esta nova tecnologia.

Todavia, a aplicação desta tecnologia dependerá fundamentalmente do estabelecimento de protocolos clínicos adequados. Aspectos relativos às melhores condições de aderência e de proliferação das células associadas aos biomateriais ainda deverão ser melhores explorados. De acordo com os dados apresentados acima, a densidade celular parece desempenhar um papel importante neste sentido. As condições de pré-tratamento das matrizes também demonstraram exercer influência sobre a associação das células com os biomateriais.

Por fim, as diferenças observadas no comportamento entre as hCTAD, cCTAD e mCTAD sugerem que novos estudos possam implementar modelos experimentais baseados em dados para diferentes espécies.

5. REFERÊNCIAS

- Acesso a partir do site <http://www.adistem.com/idiopathic-pulmonary-fibrosis.html>, em dezembro-2013.
- Afanasyev BV, Elstner EE, Zander AR. **A. J. Friedenstein, founder of the mesenchymal concept.** Cell Therap. & Transplant. 2009;1(3):35-8.
- Arrigoni E, Lopa S, Girolamo L, Stanco D, Brini AT. **Isolation, characterization and osteogenic differentiation of adipose-**

- derived stem cells: from small to large animal models.** Stem Cells. 2009;338:401-11.
- Black LL, Gaynor J, Gahring D, et al. **Effect of adipose-derived mesenchymal stem and regenerative cells on lameness in dogs with chronic osteoarthritis of the coxofemoral joints: a randomized, double-blinded, multicenter, controlled trial.** Veter Ther. 2007;8(4):272-84.
- Black LL, Gaynor J, Adams C, et al. **Effect of intraarticular injection of autologous adipose-derived mesenchymal stem and regenerative cells on clinical signs of chronic osteoarthritis of the elbow joint in dogs.** Veter Ther. 2008;9(3):192-200.
- Boxall SA, Jones E. **Markers for characterization of bone marrow multipotential stromal cells.** Stem Cells Intern. 2012; *in press*.
- Bunnell BA, Flaat M, Gagliardi C, Patel B, Ripoll C. **Adipose-derived stem cells: isolation, expansion and differentiation.** Methods. 2008;45:115-20.
- Caplan AI. **Why are MSCs therapeutic? New data: new insight.** J Pathol. 2009;217:318-24.
- Colleoni S, Bottani E, Tessaro I, et al. **Isolation, growth and differentiation of equine mesenchymal stem cells: effect of donor, source, amount of tissue and supplementation with basic fibroblast growth factor.** Veter Res Commun. 2009;33:811-21.
- Csaki C, Matis U, Mobasheri A, Ye H, Shakibaei M. **Chondrogenesis, osteogenesis and adipogenesis of canine mesenchymal stem cells: a biochemical, morphological and ultrastructural study.** Histochem Cell Biol. 2007;128:570-20.
- Dahlgren LA. **Use of adipose derived stem cells in tendon and ligament injuries.** Proc. Amer. Coll. Veter. Surg. Symp. 2006; 150-1.
- Daley GQ, Scadden DT. **Prospects for stem cell-based therapy.** Cell 2008;132:544-8.
- Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. **Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement.** Cryotherapy. 2006;8(4):315-17.
- Eslaminejad MRB, Taghiyar L, Dehghan MM, Falahi F, Mehrjerdi HK. **Equine marrow-derived mesenchymal stem cells: isolation, differentiation and culture optimization.** Iran Journ. Veter. Res. (Shiraz Uni). 2009;10(1-26):1-11.
- Giordano A, Galderisi U, Marino IR. **From the laboratory bench to the patient's bedside: an update on clinical trials with mesenchymal stem cells.** J Cell Physiol. 2007;211(1):27-35.
- Golipour Z, Kashani IR, Akbari M, Hassanzadeh G, Malek F, Mahmoudi R. **Differentiation of adipose-derived stem cells into Schwann cell phenotype in comparison with bone marrow stem cells.** Iran J Bas Medic. Sci. 2010; 13(3):76-84.
- Hee CK, Jonikas MA, Nicoll SB. **Influence of three-dimensional scaffold on the expression of osteogenic differentiation markers by human dermal fibroblasts.** Biomaterials. 2006; 27:875-84.
- Hernández BP. **Isolation, culture and characterization of mesenchymal stem cells from adipose tissue.** Av Diabetol. 2008;24(2):138-42.
- Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, et al. **Clarification of the nomenclature for MSC: the International Society for Cellular Therapy Position statement.** Cryotherapy. 2005;7(5):393-95.
- ISO 10993-5. **Biological evaluation of medical devices – Part 5: Tests for the *in vitro* cytotoxicity**, 3ed, 2009. Disponível em www.iso.org.
- Meirelles LS, Chagastelles PC, Nardi NB. **Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues.** J Cell Sci. 2006;119(Pt 11):2204-13.

- Meirelles LS, Caplan AI, Nardi NB. **In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells.** Stem Cells. 2008;26(9):2287-99.
- Meirelles LS, Nardi NB. **Methodology, biology and clinical applications of mesenchymal stem cells.** Front. Biosci. 2009;14:4281-98.
- Mosmann T. **Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays.** J Immunol Meth. 1983;65:55-63.
- Nardi NB. **All the adult stem cells, where do they all come from? An external source for organ-specific stem cell pools.** Med Hypotheses. 2005;64(4):811-7.
- Nardi NB, Meirelles LS. **Mesenchymal stem cells: isolation, in vitro expansion and characterization.** HEP. 2006;174:249-82.
- Nardi NB, Camassola M. **Isolation and culture of rodent bone marrow-derived multipotent mesenchymal stromal cells.** Methods Mol. Biol. 2011;698:151-60.
- Nathan S, Das De S, Thambyah A, Fen C, Goh J, Lee EH. **Cell-based therapy in the repair of osteochondral defects: a novel use for adipose tissue.** Tissue Eng. 2003;9(4):733-44.
- Orbay H, Tobita M, Mizuno H. **Mesenchymal stem cells isolated from adipose and other tissues: basic biological properties and clinical applications.** Stem Cells Internat. 2012;*in press*.
- Orsi VV, Collares MVM, Nardi NB, et al. **Osso liofilizado bovino não-desmineralizado com células-tronco mesenquimais para engenharia tecidual: estudo experimental em sítio heterotópico.** Rev Soc Bras Cir Craniomaxilofac. 2007;10(4):133-9.
- Pawitan JA. **Prospect of adipose tissue derived mesenchymal stem cells in regenerative medicine.** Cell & Tissue Transplant & Therap. 2011;2:7-9.
- Pratheesh MD, Dubey PK, Nath A, et al. **Mesenchymal stem cells and it's characterization.** Vet World. 2011;4(12):571-74.
- Raabe O, Shell K, Würtz A, Reich CM, Wenish S, Arnhold S. **Further insights into the characterization of equine adipose tissue-derived mesenchymal stem cells.** Veter Res Commun. 2011;35:355-65.
- Russo FP, Parola M. **Stem and progenitor cells in liver regeneration and repair.** Cytotherapy. 2011;13(2):135-44.
- Sorrell JM, Baber MA, Traktuev DO, March KL, Caplan AI. **The creation of an in vitro adipose tissue that contains a vascular-adipocyte complex.** Biomaterials. 2011;32:9667-76.
- Spencer ND, Chun R, Vidal MA, Gimble JM, Lopez MJ. **In vitro expansion and differentiation of fresh and revitalized adult canine bone marrow-derived and adipose tissue-derived stromal cells.** Veter. Journ. 2012;191:231-39.
- Strem BM, Hicok KC, Zhu M, Wulur I, Alfonso Z, Schreiber RE, Fraser JK, Hedrick MH. **Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells.** Keio J Med. 2005;54(3):132-41.
- Taylor SE, Smith RKW, Clegg PD. **Mesenchymal stem cell therapy in equine musculoskeletal disease: scientific fact or clinical fiction.** Equine Vet J. 2007; 39(2):172-80.
- Tapp H, Hanley EN Jr, Patt JC, Gruber HE. **Adipose-derived stem cells: characterization and current application in orthopaedic tissue repair.** Exp. Biol. Med. (Maywood). 2009;234(1):1-9.
- Willerth SM, Sakiyama-Elbert SE. **Combining stem cells and biomaterial scaffolds for constructing tissues and cell delivery.** StemBook (www.stembook.org) 2008;1-18.
- Witkowska-Zimny M, Walenko K. **Stem cells from adipose tissue.** Cell Mol Biol Lett. 2011;16(2):236-57.
- Wu X, Liu X, Wang S. **Implantation of biomaterials as an efficient method to harvest mesenchymal stem cells.** Exp. Biol. Med. 2011;236(12):1477-84.

Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, et al. **Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies.** Tissue Eng. 2001;7(2):211-28.

Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, et al. **Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells.** Mol. Biol. Cell. 2002;13(12):4279-95.

Zuk PA. **The adipose-derived stem cell: looking back and looking ahead.** Mol. Biol. Cell. 2010;21:1783-87.