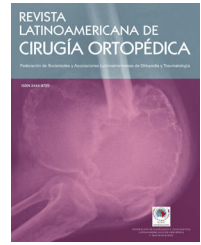




Revista latinoamericana de cirugía ortopédica

www.elsevier.es/rslaot



Revisión

Células madre y progenitoras para la reparación de cartílago articular



Francisco Rodriguez-Fontan^a, Jorge Chahla^b, Nicolas S. Piuizzi^{c,d}, Karin Payne^{a,e}, George F. Muschler^c, Robert F. LaPrade^b y Cecilia Pascual-Garrido^{a,*}

^a Department of Orthopedics, University of Colorado Denver, Aurora, Colorado, Estados Unidos

^b Steadman Philippon Research Institute, Vail, Colorado, Estados Unidos

^c Department of Orthopedic Surgery and Bioengineering, Cleveland Clinic Foundation, Cleveland, Ohio, Estados Unidos

^d Instituto Universitario, Hospital Italiano de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina

^e Regenerative Orthopedics Laboratory, University of Colorado Denver, Aurora, Colorado, Estados Unidos

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 15 de septiembre de 2016

Aceptado el 6 de octubre de 2016

On-line el 27 de octubre de 2016

Palabras clave:

Cartílago

Células madre

Artrosis

Lesiones condrales focales

Células progenitoras

R E S U M E N

El cartílago es un tejido sensible propenso a la degeneración con la práctica continua de deporte y el proceso de envejecimiento, con baja capacidad de auto-reparación. Las enfermedades articulares degenerativas están entre las más profundamente invalidantes y limitantes en cuanto actividades diarias y calidad de vida. Las terapias biológicas se han vuelto disponibles para potencialmente tratar artrosis y lesiones condrales focales. Sin embargo, aun no hay manera eficiente de regenerar cartílago hialino nativo. Las terapias con células madre y la bioingeniería constituyen un terreno prometedor, el cual puede transformar los paradigmas en ortopedia. Esta revisión provee una visión en conjunto del corriente estado de las terapias con células madres y progenitoras. Resumimos opciones de células expandidas en cultivo y además, cuatro fuentes frecuentes de células madre adultas: médula ósea, tejido adiposo, tejido sinovial y sangre venosa periférica, junto a estudios clínicos reportando su eficacia. El propósito de esta revisión es resumir el potencial reportado de terapias con células madre adultas enfocándonos en lesiones condrales focales y artrosis.

© 2016 Federación de Sociedades y Asociaciones Latinoamericanas de Ortopedia y Traumatología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

* Autor para correspondencia.

Correos electrónicos: Cecilia.pascual-garrido@ucdenver.edu, cpgruns@gmail.com (C. Pascual-Garrido).
<http://dx.doi.org/10.1016/j.rslaot.2016.10.002>

2444-9725/© 2016 Federación de Sociedades y Asociaciones Latinoamericanas de Ortopedia y Traumatología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Stem and Progenitor Cells for Articular Cartilage Repair

A B S T R A C T

Keywords:

Cartilage
Stem cells
Osteoarthritis
Focal chondral lesions
Progenitor cells

Cartilage is a sensitive tissue prone to damage with the continuous practice of sports and ageing process, holding a low self repairing capacity. Degenerative joint diseases are among the most disabling and limiting in regards to life quality and daily activities. Biological therapies have become available to potentially treat osteoarthritis and focal chondral defects. However, there is still no efficient way to regenerate native hyaline cartilage. Stem cell therapy and bioengineering is a promising field which can transform the paradigms in orthopaedics. This review provides an overall view of the current state of biological therapies with stem and progenitor cells. We summarize cell therapy options with culture expanded cells and also four common sources of adult stem cells: bone marrow, adipose tissue, synovium and peripheral venous blood, along with clinical studies reporting their effectiveness. The purpose of this review is to summarize adult stem cells approaches for the treatment of focal chondral lesions and osteoarthritis.

© 2016 Federación de Sociedades y Asociaciones Latinoamericanas de Ortopedia y Traumatología. Published by Elsevier España, S.L.U. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Introducción

Las terapias celulares están emergiendo como tratamientos prometedores para muchas condiciones musculoesqueléticas que afectan a atletas y a la población adulta¹⁻³. Las terapias con células madre y progenitoras proveen potencial para beneficio clínico, mediante mecanismos de regeneración tisular e inmunomodulación⁴⁻⁹. En cirugía ortopédica, lesiones condrales focales, artrosis, fracturas y lesiones de tejido blando como: tendones, músculos y ligamentos son terrenos fértiles para terapias con células madre.

Las células progenitoras incluyen cualquier célula que puede proliferar para formar progenie y estas, a su vez, diferenciarse en un tejido adulto. Las células madre son un subconjunto de células progenitoras que poseen «capacidad de autorrenovación»¹⁰⁻¹⁴. Este es un proceso donde la célula se divide de forma asimétrica, produciendo 2 células hijas. Una célula hija es idéntica a la célula inicial y permanece disponible para otra división asimétrica de «autorrenovación». La segunda célula hija, una célula progenitora, que al contrario de la célula madre procede a dividirse y diferenciarse. Las células progenitoras son ampliamente más frecuentes que las células madre en los tejidos. A menudo, el término «célula madre» es usado incorrectamente para describir ambas células progenitoras y madre en conjunto^{15,16}. El uso de nomenclatura precisa y estandarizada es crucial para el entendimiento del comportamiento biológico de células in vivo e in vitro, y mejora la comunicación científica.

Las células madre pueden ser clasificadas de varias maneras: 1) autólogas o alogénicas; 2) adultas, embrionarias o células madre pluripotentes inducidas (iPSC), y 3) nativas (tejido residente) o células expandidas. El propósito de esta revisión es determinar la utilidad de células madre adultas en ortopedia, con especial foco en lesiones condrales focales y artrosis, indicando fuentes, seguridad, eficacia y resultados objetivos y subjetivos¹⁷.

Las células madre embrionarias (ESC) tienen potencial de diferenciación pluripotente, hacia todos los tejidos, como derivados de: ectodermo, endodermo o mesodermo¹⁴. Se obtienen del embrión en sus primeros estadios^{18,19} y, frecuentemente, plantean condicionantes éticos¹⁸ y riesgo de transformación oncogénica^{20,21}. Los avances en manipulación genética de las células fibroblásticas adultas, principalmente de la dermis, y de células fetales han generado iPSC, a través de mecanismos de reprogramación genética viral y no viral²²⁻²⁶. Son también células pluripotentes por naturaleza, y como pueden obtenerse de tejido adulto, no están asociadas con problemas éticos circundando ESC. Por el contrario, las células madre adultas tienen la capacidad de diferenciarse en uno o más fenotipos de tejidos embrionariamente relacionados; pueden obtenerse fácilmente de diversos tejidos, no presentan cuestiones éticas y usualmente no se han asociado con riesgos de transformación maligna²⁷.

Nomenclatura de células madre adultas y células progenitoras

Se han utilizado términos muy diferentes para describir las mismas poblaciones de células madre adultas y progenitoras en tejido nativo. En una aproximación para proveer esclarecimiento, fue propuesto el término progenitoras de tejido conectivo (CTP), que incluye la población heterogénea nativa (tejido residente) entera de células madre y progenitoras, con el potencial de activarse y generar progenie que puede contribuir hacia uno o más tejidos conectivos (p. ej., óseo, adiposo, cartílago, fibroso, sangre y músculo)^{10,11,28}. Las CTP son residentes y pueden ser cosechadas de médula ósea, tejido adiposo o cartílago, entre otros tejidos. Sin embargo, las CTP en cada tejido tienen, a menudo, diferentes nichos, potencial y atributos biológicos. El término CTP reconoce que estas células derivadas de tejido no son una población uniforme, y hasta que se logre una detallada caracterización, las CTP podrán solamente ser detectadas por su capacidad de proliferar y

Tabla 1 – Comparación de expresión de CD y potencial condrogénico

Célula madre	Proceso secuenciado para recolección	Marcadores CD positivos	Marcadores CD negativos	PC	Concentración de células madre
SDSC ³⁴⁻³⁸	Tejido sinovial y subsinovial, digestión enzimática, filtrado, cultivo (aprox. 2 semanas)	44, 69, 73, 90, 105, 106, 166, 271 es la subpoblación más condrogénica	11b, 34, 45	^c	1.000-30.000/ml
BM-MSc ^{33,39,40}	BMA, centrifugado, cultivo (aprox. 2-4 semanas)	73, 90, 105	14, 34, 45, o 11b, 79alpha, o 19 y HLA DR	^b	1-300.000/ml (dependiendo de la edad del paciente, sitio, sexo y salud; y técnica del proceso de recolección)
PBMC ^{41,42} o PBPC ^{43,44}	Sangre fresca en EDTA, centrifugado, cultivo hipóxico o normóxico (aprox. 2-4 semanas); o administración subcutánea seriada de G-CSF, seguido de aféresis	34, 45, 133 (recién aisladas/condición normóxica) entre otros 44, 90, 105, 106, 146, 166 y Stro-1	Marcadores para MSC 34, 45, 133 (condiciones hipóxicas)	^b	2-5 × 10 ⁶ /kg del peso del paciente (población de células madre heterogéneas)
ASC ^{39,45-49}	Lipoaspirado o almohadilla grasa infrarrotuliana, digestión enzimática, centrifugado, cultivo (aprox. 2-4 semanas)	13, 29, 44, 73, 90 y 105 (> 80%), 34 (inicialmente), 36, 10, HLA ABC entre otros	11b, 31, 45, 106, HLA DR entre otros	^a	5.000-1.500.000/ml

ASC: células madre adiposas; BMA: aspirado de médula ósea; BM-MSc: células madre mesenquimales derivadas de médula ósea; EDTA: ácido etilenediaminetetraacético; G-CSF: factor estimulante de colonias de granulocitos; PBMC: células mononucleares de sangre periférica; PBPC: células progenitoras de sangre periférica; PC: potencial condrogénico; SDSC: células madre derivadas de tejido sinovial.

^a Bajo.

^b Moderado.

^c Alto.

formar colonias en una superficie 2D o en ensayos de medios viscosos 3D de unidades formadoras de colonias (UFC)^{10,11,28}.

Por el contrario, las células cultivadas difieren de las células nativas y mínimamente manipuladas. Las células expandidas en cultivo proveen poblaciones más homogéneas y numerosas que las derivadas de tejido nativo. No obstante, los atributos celulares pueden cambiar rápidamente en un cultivo. El ejemplo más conocido y comercializado de células expandidas en cultivo son las células madre mesenquimales (MSC)²⁹. Las MSC son células adultas, plásticas, adherentes y expandidas en medios de cultivo, que para ser clasificadas como células que retienen la capacidad de diferenciación trilineal (cartílago, óseo o tejido adiposo)³⁰⁻³² deben expresar los siguientes marcadores de superficie CD105, CD73 y CD90, y la falta de expresión de CD45, CD34, CD14 o CD11b, CD79alpha o CD19 y HLA-DR moléculas de superficie³³ (tabla 1).

La Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT) desarrolló los criterios que definen las MSC^{29,33}. Sin estas características, el término MSC no debería usarse. La definición de las MSC, a pesar de no ser ideal, ha ayudado a ordenar

el uso indiscriminado de «MSC» para describir todo fibroblasto expandido en medio de cultivo sin importar las características. Sin embargo, información reciente demuestra que una población de MSC, que cumple con estos criterios, puede variar ampliamente en cuanto a potencial biológico⁵⁰. Todavía no disponemos del grupo de marcadores específicos que identifican las CTP de tejidos nativos. Pero, la concentración, la prevalencia y el potencial biológico pueden ser estimados con ensayos de UFC in vitro. Los ensayos de CTP se han mejorado usando criterios incorporados por la Sociedad Americana de Pruebas de Materiales (ASTM): «Ensayos de unidad formadora de colonias automatizada (UFC)-Adquisición de imágenes y método de análisis para la enumeración y caracterización de células y colonias de cultivo» para uso con sistemas automatizados para análisis de imágenes⁵¹. Tradicionalmente, los métodos utilizados para cuantificar colonias han demostrado estar sujetos a una amplia variación interobservador⁵².

Cuando el tejido está recién recolectado (p. ej., aspirado de médula ósea [BMA]) contiene CTP, pero la prevalencia y la función de estas CTP no puede calcularse sin ensayos de UFC.

Tabla 2 – Factores de crecimiento para diferenciación trilineal

Célula adulta deseada	Medio de cultivo que conduce	Tinción
Condrocito	Ácido ascórbico, BMP-6-7, TGF- β 3, dexametasona, insulina, IGF-1, FGF	Azul alcian, safranina o/verde rápido
Osteoblasto	Ácido ascórbico, BMP-2, dexametasona, 1,25 OH vitamina D3	Rojo alizarina/Picrosirius Red
Adipocito	Dexametasona, metilxantina de isobutilo, indometacina, insulina, tiazolidinediona	Oil red O o sudán

BMP: proteína morfogénica ósea; FGF: factor de crecimiento fibroblástico; IGF: factor de crecimiento insulínico; TGF: factor de crecimiento transformante.
Tomado de Johnstone et al.⁷¹, Gimble et al.⁷², Estes et al.⁷³ y Zuk et al.⁷⁴.

Por lo tanto, si son usadas células sin procesar ni cuantificar, deberían describirse de la medida métrica más cuantitativa posible, por ejemplo, células nucleadas mixtas derivadas de tejido (MTDNC)⁵³, o células nucleadas mixtas de médula ósea (MBMDNC).

Como las CTP, son una población heterogénea de células madre y progenitoras residentes en tejido nativo, estas incluyen las células proliferativas de las cuales derivan las células expandidas MSC. No obstante, los atributos de las colonias formadoras de CTP difieren de los atributos que definen a las MSC de la ISCT. Se cree que ambas células madre y progenitoras están en casi cualquier tejido del cuerpo y tienen la habilidad para migrar hacia los lugares de la lesión y ser capaces de neoformar nuevos tejidos⁵⁴⁻⁵⁸ que asisten con regeneración tisular, ya sea directamente por medio de diferenciación hacia células adultas o indirectamente mediante citocinas, factores de crecimiento, quimiocinas para inmunomodulación, estimulando la angiogénesis y reclutando células progenitoras específicas del tejido nativo con el fin de crear un microambiente regenerativo⁵⁹⁻⁶².

Fuentes de células madre y células progenitoras

Las células madre y CTP pueden ser aisladas de cualquier tejido conectivo⁶³⁻⁶⁶. Las células obtenidas de cada fuente de tejido presentan variación intrínseca en cuanto a capacidad de proliferación y diferenciación hacia ciertas líneas celulares⁶⁷. Se obtienen mejores resultados en la supervivencia del injerto cuando se cosechan células del mismo tejido o tejido vecino del cual se van a usar para regenerar⁶⁸. Especial atención merece el destino del injerto, ya que este puede afectarse por el sitio del cual se colectan las células y de sus características.

Cuando las células se expanden en cultivo, la suplementación con factores de crecimiento asisten en la diferenciación de MSC hacia cualquiera de las 3 líneas celulares⁶⁹⁻⁷¹ (tabla 2).

Células progenitoras derivadas de médula ósea

La médula ósea es una de las fuentes más comunes para la cosecha de células madre y progenitoras, usualmente por medio de aspiración de la cresta iliaca. Las CTP forman una población pequeña dentro de la médula ósea. Su concentración promedia entre 1.000 y 2.000 CTP/ml de aspirado, con una prevalencia estimada entre 1×10^{-4} a 1×10^{-6} células⁷⁵, dependiendo de las variables del paciente y la técnica de aspirado^{40,76-78}. El BMA es la fuente más utilizada en terapia celular por su fácil accesibilidad y la larga experiencia⁷⁹⁻⁸². La técnica óptima estima, al menos, un aspirado de 2-4 ml por

punción y deben efectuarse las punciones necesarias hasta conseguir el volumen deseado, insertando el trocar profundamente en el hueso iliaco, retrayendo tras cada aspirado 5 mm la aguja. Esto incrementa el rendimiento de CTP cosechadas, limitando la hemodilución por sangre periférica^{40,76,83,84}. Si se aspira 10 ml en una única vez, la concentración de CTP cae de 2 a 4 veces⁴⁰. El procesamiento de la muestra puede incrementar la concentración y la prevalencia de CTP, por remoción de glóbulos rojos, suero y células no CTP de una población celular mixta^{77,85}.

Hay diferentes alternativas para obtener un número superior de células madre/progenitoras de una muestra de BMA, expandirlas en medio de cultivo in vitro para obtener BM-MS, o técnicas de procesamiento, como separación por densidad. Actualmente, se realizan preparaciones de concentrado de BMA (BMAC) autólogo para usar directamente intraoperatorio para implantar BMA con mínima manipulación⁸⁶. Un defecto del BMAC es la población celular heterogénea encontrada en el preparado, incluyendo endotelial, hematopoyético y células inflamatorias. Las preparaciones también varían ampliamente entre individuos y debido a edad y sexo^{78,87-90}, y por sitio de aspirado dentro de un mismo paciente. Los métodos de separación de densidad para preparar BMAC generalmente requieren al menos 60 ml of BMA de la cresta iliaca anterior o posterior, pero este volumen no se aspira en un solo sitio. El BMA es idealmente aspirado en múltiples muestras de 2-4 ml (para reducir hemodilución) a través de perforaciones corticales, yendo profundo dentro de la cavidad medular usando la misma incisión cutánea⁸⁴. Esto es hecho en una técnica perpendicular (a la cresta iliaca): teniendo la aguja dentro de la cavidad medular, avanzando cada 5-10 mm usando el obturador y en una proyección en abanico, una o 2 veces seguido de aspiración, permite 2 o 3 aspirados a través de la misma perforación cortical, y luego moverse hacia una nueva perforación cortical. Otro abordaje es la técnica en paralelo (a las tablas internas y externas de la cresta iliaca): avanzando cada 5-10 mm usando el obturador entre ambas tablas y en una proyección en abanico, permite 3 o más aspirados¹⁰. La centrifugación (separación por densidad) es usada para remover plaquetas, granulocitos y glóbulos rojos. Este paso concentra el número de células y CTP, por lo tanto, las células que se van a utilizar intraoperatorio⁸⁴ (fig. 1).

Tejido adiposo

Otra fuente común de terapia con células madre y progenitoras es el tejido adiposo^{91,92}. Es principalmente recolectado de aspirado o liposucción, o remoción quirúrgica (p. ej.,

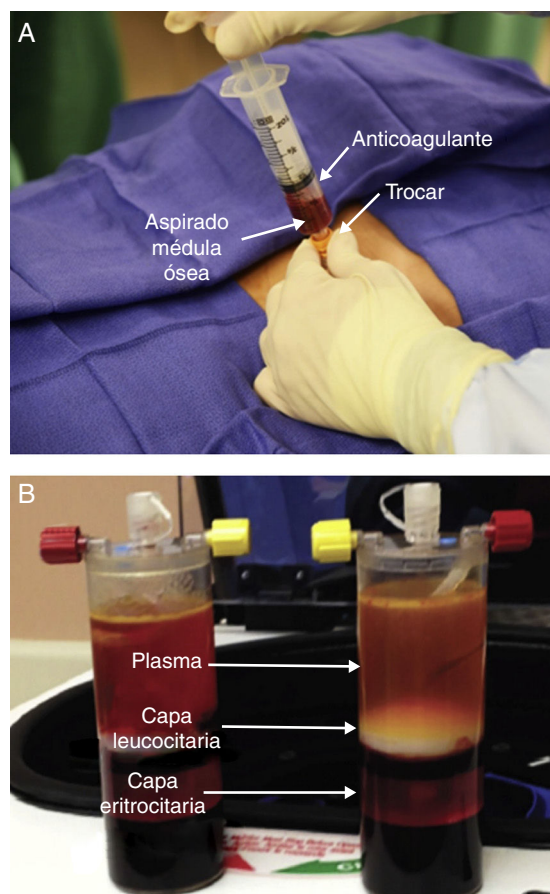


Figura 1 – Foto demostrando técnica de recolección de médula ósea (A) seguido de BMAC de la muestra con 3 capas definidas (B).

una fuente emergente reciente es la almohadilla grasa infrarrotuliana)^{74,93,94}. Es por lejos menos celular que el aspirado de médula ósea, pero la prevalencia de CTP es mayor, promediando 1 en 4.000 células. Algunos autores consideran el tejido adiposo como una reserva atractiva y fácilmente disponible para terapia con células madre⁹⁵. Sin embargo, colonias formadoras de CTP derivadas de tejido graso y expandidas en cultivo presentan patrones de comportamiento, proliferación y diferenciación celular, comparadas con CTP de la médula ósea. Por consiguiente, una mejor categorización es necesitada⁹¹. Estas variables son, a su vez, afectadas con los mismos factores intrínsecos mencionados anteriormente, como individuales, edad y sexo. Estudios han reportado que células madre adiposas (ASC) tienen capacidad condrogénica y osteogénica reducida en las mismas condiciones estándar de cultivo⁹⁶⁻⁹⁹, a favor de una diferenciación más robusta hacia células musculares y cardiomiocitos¹⁰⁰. Esto puede ser, en parte, debido a la baja expresión endógena del ARN mensajero de proteína morfogénica ósea (BMP) para los subtipos 2, 4 y 6, y por carecer de la expresión de factor de crecimiento transformante (TGF- β -receptor-1)⁹⁶. Las BMP promueven diferenciación condrogénica y producción de cartílago y poseen estimulación autocrina sobre otras MSC para producir los mismos factores. Usando ASC cultivadas bajo factores condrogénicos, la diferenciación condrogénica y la formación de

cartílago tienen lugar, siendo la combinación más potente la de TGF- β y BMP-6.

Diferentes nombres llevan a la confusión cuando se refieren a las células madre derivadas de tejido adiposo. La Federación Internacional de Terapéutica Adiposa y Ciencia determinó que el término a adoptar cuando se refiere a células expandidas en cultivo aisladas, plástico adherente y multipotente debe ser el de «células madre derivadas de tejido adiposo (ASC)»⁷². Hay abundantes depósitos de tejido graso blanco subcutáneo para la recolección de células madre: brazo, muslo, abdomen y mama¹⁰¹. La secuencia estándar consiste sobre lipoaspirado tumescente, seguido de digestión enzimática usando colagenasa, tripsina, dispasa, entre otras enzimas, en combinaciones variadas, en determinado tiempo (30 a 60 min) y temperatura (37 °C)⁴⁵. Una vez que las enzimas son neutralizadas, continúa el centrifugado, permitiendo la separación de los adipocitos maduros flotantes de la fracción vascular estromal (SVF), una población celular heterogénea conformada por glóbulos rojos, fibroblastos, células endoteliales, linfocitos, pericitos, monocitos, células estromales adiposas, células madre hematopoyéticas y células progenitoras^{102,103}. Finalmente, las células de la SVF son sembradas en cultivo y, luego de purificarlas a través de lavados y expandirlas en medio de cultivo sucesivamente, similar a las usadas con BM-MSC, con el fin de la depleción de la mayoría de las células hematopoyéticas, se obtienen las ASC. La cantidad usada también varía desde 5.000 a 1.500.000/ml de tejido colectado³⁹. Diferentes métodos fueron propuestos para extraer ASC. Por ejemplo, la liposucción asistida por ecografía pareció prometedora comparada a la estándar liposucción tumescente, pero estudios posteriores demostraron que la viabilidad de las células madre y la capacidad proliferativa parecen disminuir por estos medios¹⁰⁴. Las ASC, similares a las BM-MSC, exhiben diferentes atributos y comportamiento, ya que el potencial de diferenciación tiende hacia tejido muscular y el inmunofenotipo es levemente diferente aunque más del 90% de los marcadores superficiales son idénticos^{72,93,105-107} (tabla 1).

Sinovial

Las células madre derivadas de tejido sinovial (SDSC) son reconocidas como una opción viable para reparar el cartílago¹⁰⁸ y los estudios clínicos y experimentales han demostrado que el tejido sinovial tiene el mayor rédito¹⁰⁹ celular comparando con células derivadas de tejido adiposo, muscular, médula ósea, periostio y sinovial y, no obstante, oscilando desde 1.000 a 30.000 células madre/ml por tejido colectado³⁹. En términos de diferenciación, se ha reportado que poseen mayor potencial adipogénico y condrogénico que las BM-MSC^{35,109,110}. Tras aislar SDSC, presentan un conjunto de marcadores identificables con subpoblaciones inmunofenotípicas que reflejan diferente potencial condrogénico y familiaridad con BM-MSC^{34,35} (tabla 1). La rodilla es el sitio más estudiado para la recolección de SDSC y el procedimiento estándar consiste en obtener tejido sinovial y subsinovial por artroscopia, seguido de digestión enzimática con una solución de colagenasa/dispasa, a 37 °C durante 3 h, para ser después filtradas para dar suspensiones

celulares que serán cultivadas en distintos medios dependiendo del tejido adulto deseado¹¹¹.

Sangre periférica

Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC)¹¹² o células progenitoras de sangre periférica (PBPC)⁴³ proveen nuevas perspectivas en terapia celular con células madre que no deben ser subestimadas, pues están involucradas en la regeneración tisular orgánica¹¹³⁻¹¹⁵. Las PBMC son una población heterogénea cosechada de sangre fresca periférica⁴¹ para lo cual tomamos una muestra de sangre venosa periférica que debe ser centrifugada. Las células nucleadas de la capa leucocitaria pueden ser congeladas y conservadas para ser utilizadas posteriormente o expandidas en cultivo. Cuando son recién colectadas, la citometría de flujo para PBMC muestra una expresión del 90% para marcadores hematopoyéticos CD34 y CD45, y negativo para conjunto de marcadores de MSC. La sangre periférica no contiene en circunstancias normales CTP o células símil-MSC. Estas se encuentran embebidas en nichos dentro de la médula ósea y sometidas a baja tensión de oxígeno. Las CTP se pueden presentar en el torrente sanguíneo luego de un traumatismo o de una estimulación medular¹¹⁶. Los estudios comparativos han demostrado diferentes patrones de crecimiento y marcadores celulares cuando se cultivan PBMC humanas en diferentes condiciones de tensión de oxígeno⁴¹ (tabla 1). En condiciones hipóxicas, similares a las de los nichos en la médula ósea, las células expresan más de 90% de marcadores de MSC y mantienen su potencial de diferenciación trilineal para tejidos condrogénicos, osteogénicos y adipogénicos⁴¹. Este fenómeno refleja el uso potencial para la reparación de cartílago, el cual es hipóxico por naturaleza. Por el contrario, en condiciones normóxicas, las PBMC producen células similares a los macrófagos adherentes, expresando menos del 50% de marcadores de MSC⁴¹.

Otro abordaje empleado para recolectar estas células con un mayor rendimiento, exige, la semana previa a la extracción de sangre, administrar subcutáneamente el factor estimulante de colonias de granulocitos pues regula y promueve la liberación de neutrófilos y monocitos desde la médula ósea hacia el torrente sanguíneo, incrementando la concentración circulante de PBMC. Estas PBMC movilizadas pueden ser recolectadas con un separador celular automatizado (aféresis), usando un acceso venoso central o periférico^{43,117-119}. En los adultos sanos, dependiendo del protocolo utilizado, el rendimiento promedia $2-5 \times 10^6$ CD 34⁺ células por kilogramo de peso del paciente^{42,44}. Cuando las PBMC son separadas en sus diferentes componentes celulares, para aislar las células madre y progenitoras (p. ej., monocitos CD14⁺, granulocitos, linfocitos), a través de CD14 y CD105, y son cultivadas en medio hipóxico y normóxico, todas se diferenciaron hacia células semejantes a macrófagos adherentes y evitando su diferenciación celular semejante a fibroblastos⁴¹. Esto sustenta la importancia de señalización intercelular a través de contacto directo y quimiocinas, en una población celular heterogénea¹²⁰⁻¹²³. El cocultivo celular de PBMC y ASC en un medio condrogénico muestra una diferenciación sinérgica y una potenciación migratoria hacia poblaciones de ASC¹²¹. Por ende, esto refleja la señalización celular como pieza central para la reparación de cartílago. Aparentemente, la hipoxia

es una piedra angular para estimular la migración mononuclear desde los vasos sanguíneos (medio normóxico) hacia el tejido lesionado, y diferenciándose hacia células hematopoyéticas y no hematopoyéticas¹²⁴. Estudios experimentales muestran resultados prometedores en la reparación de lesiones osteocondrales^{41,125-128} (tabla 1).

¿Por qué utilizar la terapia celular con células madre y células progenitoras?

El cartílago articular es un tejido que soporta peso y fricción, y está compuesto de matriz extracelular, principalmente colágeno-2, proteoglicanos, agreganos y condrocitos. El hueso subcondral es su único soporte vascular¹²⁹. Su baja celularidad y avascularidad lo exponen a una capacidad limitada para la regeneración y restauración¹³⁰. Los defectos en el cartílago pueden ser condrales o de grosor parcial, cuando está confinado a cartílago articular, u osteocondrales o de grosor completo, cuando el defecto es lo suficientemente profundo para afectar el hueso subcondral. Estas lesiones se pueden clasificar según la clasificación de Outerbridge, yendo de 0 a 4, dependiendo de cuán severa y profunda es la lesión^{131,132}. Generalmente, mientras no hay reparación en defectos condrales, un intento se ve en los defectos osteocondrales debido al aporte sanguíneo subcondral, resultando un tejido subóptimo formado por células madre y progenitoras migrando desde la médula ósea¹³³. Pequeñas lesiones de grosor completo son reparadas con cartílago hialino, pero las lesiones grandes son usualmente reparadas por formaciones de fibrocartílago^{57,134}. Actualmente, múltiples tratamientos son usados para lesiones de cartílago. Estos incluyen microfractura, lavado artroscópico y desbridamiento, trasplante osteocondral autólogo o alogénico, e implantación de condrocitos autólogos¹³⁵, entre otros. A pesar de que prometen resultados y alivio del dolor a plazos intermedios, la principal desventaja es que algunos de ellos son procedimientos que se realizan en 2 pasos, donde la colecta y la expansión de condrocitos se necesitan. Además, muchas de estas terapias generalmente llevan a la formación fibrocartílago¹³⁶. Este último es un tejido tipo hialino, compuesto principalmente por colágeno 1 y que presenta por lejos menos resistencia a la carga y a la fricción, llevando eventualmente a la rotura y a artrosis secundaria a largo plazo¹³⁷.

La artrosis es una enfermedad articular altamente prevalente que afecta a atletas luego de traumatismos y a población envejeciendo¹³⁸. Múltiples factores forman parte de la fisiopatología de la artrosis, como el sexo, la edad, las lesiones, la obesidad, la desalineación articular y la predisposición genética. Características comunes incluyen inflamación crónica, con lesiones subcondrales y degeneración articular progresiva. La progresión lleva a la pérdida de función en estadios finales debido al dolor ascendente, la inflamación y la pérdida del rango de movimiento¹³⁹. Puede afectar a múltiples articulaciones, siendo la rodilla y la cadera las más prevalentes e incapacitantes¹. Los tratamientos actuales para la artrosis temprana a moderadamente avanzada incluyen analgésicos antiinflamatorios no esteroideos, corticoides, ácido hialurónico y fisioterapia; no obstante, ninguno parece detener la progresión degenerativa y en el mejor escenario proveen cierta analgesia y mejoran la función. Esto propone una

oportunidad para que la terapia con células madre dé un paso adelante en investigación e innovación, debido a su perfil hipoinmunogénico¹⁴⁰, actividad inmunosupresora, como también a su proliferación y capacidad de diferenciación hacia tejidos adultos.

Hasta la fecha, el BMAC obtenido por el proceso de separación por densidad (centrifugado) es una de las pocas terapias celulares que es autorizado por la Food and Drug Administration (FDA) para aplicar células progenitoras. Toda otra forma de manipulación superior está en las secciones 361 y 351 del Public Health Safety Act¹⁴¹. La FDA categoriza las terapias con células madre como células humanas, tisulares y celular, y productos a base de tejidos (HCT/Ps). La sección 361 encarga a la FDA regular HCT/Ps de bajo riesgo y provee seguridad en cuanto a su uso, sin requerir estudios preclínicos. Cuatro principios deben cumplirse para categorizarse de bajo riesgo: 1) manipulación mínima; 2) autólogo o sin efecto sistémico; 3) producto sin combinación, y 4) uso homólogo. Si un producto no cumple con todos estos 4 principios, debe ser regulado en la sección 351, que demanda estudios preclínicos, estudios clínicos y revisión previa a la comercialización. Poca o ninguna terapia con células madre está en la sección 361¹⁴².

Evidencia clínica y eficacia para lesiones condrales focales y artrosis

Múltiples investigadores clínicos han reportado sobre la eficacia y la seguridad de las terapias con células madre en la reparación de cartílago para la artrosis y las lesiones condrales focales. Varios ensayos clínicos^{53,117,143-147} han presentado los resultados en terapias celulares. A pesar de que muestran heterogeneidad significativa en las terapias celulares utilizadas, el común denominador es que la gran mayoría de ellos demostraron resultados positivos, con mínimos efectos adversos posquirúrgicos. En una revisión sistemática sobre terapias celulares intraarticulares para defectos condrales focales y artrosis de la rodilla¹⁶, se exponen estos trabajos publicados de forma precisa y comparativa. Contrariamente, podría ser prematuro generalizar que toda terapia celular provee beneficio para el tratamiento de pacientes comparada con otros tratamientos disponibles.

La eficacia debe ser testeada con rigurosos ensayos cegados y aleatorizados, muestras poblacionales grandes y mayor seguimiento a largo plazo. Los resultados evaluados con minuciosas mediciones estandarizadas, como las utilizadas en los estudios arriba mencionados¹⁴⁸, y la inclusión de imágenes, artroscopia por «second look» con toma de biopsia, deberían ser el pilar. Estudios clínicos de alta calidad serán la respuesta a una población activa en busca de niveles más altos de mejoramiento¹⁴⁹ y la importancia de ensayos cegados en estudios futuros debería sobrepasar el alto nivel de expectación de los pacientes enrolados, el cual constituye una fuente de sesgo^{150,151}.

Conclusión

Células madre y progenitoras sostienen un futuro prometedor. Ha habido un avance significativo en las opciones de terapia celular para la artrosis y lesiones condrales focales.

En conjunto, estas terapias mínimamente manipuladas de células autógenas parecen ser seguras. Se requiere una técnica rigurosa para identificar, conocer la concentración y el potencial terapéutico de las células madre y células progenitoras implantadas. Hay una necesidad para la estandarización comenzando con la nomenclatura de células madre, el procesamiento celular y la medición de resultados.

En los subsiguientes años, la terapia con células madre podría llegar a ser terapia de primera línea dentro de la ortopedia. Esto va a requerir un crecimiento paralelo de adjuntos para células madre como matrices o plataformas, plasma rico en plaquetas, factores de crecimiento solubles, entre otras técnicas de bioingeniería. Todos estos tienen potencial para un esfuerzo sinérgico sustancial.

Conflicto de intereses

Dr. Pascual Garrido recibe apoyo para la investigación a través de Biomet-Zimmer. Dr. Muschler recibe financiación de National Institutes of Health (NIH) y del Departamento de Defensa. Es consultor de la FDA y de NIH, y recibe financiación de Fortus para la investigación. Dr. LaPrade es consultor y recibe regalías de Arthrex, Ossur y Smith & Nephew. Los demás autores declaran no tener actual o potencial conflicto de interés en relación con este artículo.

BIBLIOGRAFÍA

- Gupta PK, Das AK, Chullikana A, Majumdar AS. Mesenchymal stem cells for cartilage repair in osteoarthritis. *Stem Cell Res Ther.* 2012;3:25.
- Mithoefer K, McAdams T, Williams RJ, Kreuz PC, Mandelbaum BR. Clinical efficacy of the microfracture technique for articular cartilage repair in the knee: An evidence-based systematic analysis. *Am J Sports Med.* 2009;37:2053-63.
- Jorgensen C, Djouad F, Bouffé C, Mrugala D, Noël D. Multipotent mesenchymal stromal cells in articular diseases. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2008;22:269-84.
- Ross R, Everett NB, Tyler R. Wound healing and collagen formation. VI. The origin of the wound fibroblast studied in parabiosis. *J Cell Biol.* 1970;44:645-54.
- Sugaya K. Potential use of stem cells in neuroreplacement therapies for neurodegenerative diseases. *Int Rev Cytol.* 2003;228:1-30.
- Chapel A, Bertho JM, Bensidhoum M, Fouillard L, Young RG, Frick J. Mesenchymal stem cells home to injured tissues when co-infused with hematopoietic cells to treat a radiation-induced multi-organ failure syndrome. *J Gene Med.* 2003;5:1028-38.
- Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M, Milanese M, Longoni PD, Matteucci P, et al. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood.* 2002;99:3838-43.
- Le Blanc K, Rasmussen I, Götherström C, Seidel C, Sundberg B, Sundin M, et al. Mesenchymal stem cells inhibit the expression of CD25 (interleukin-2 receptor) and CD38 on phytohemagglutinin-activated lymphocytes. *Scand J Immunol.* 2004;60:307-15.
- Jorgensen C, Noel D. Mesenchymal stem cells in osteoarticular diseases. *Regen Med.* 2011;6 Suppl:44-51.

10. Muschler GF, Nakamoto C, Griffith LG. Engineering principles of clinical cell-based tissue engineering. *J Bone Joint Surg (Am)*. 2004;86-A:1541–58.
11. Muschler GF, Midura RJ, Nakamoto C. Practical modeling concepts for connective tissue stem cell and progenitor compartment kinetics. *J Biomed Biotechnol*. 2003;2003:170–93.
12. Patel J, Wong HY, Wang W, Alexis J, Shafiee A, Stevenson AJ, et al. Self-renewal and high proliferative colony forming capacity of late-outgrowth endothelial progenitors is regulated by cyclin-dependent kinase inhibitors driven by notch signaling. *Stem Cells*. 2016;34:902–12.
13. Gerson SL. Mesenchymal stem cells: No longer second class marrow citizens. *Nat Med*. 1999;5:262–4.
14. Itskovitz-Eldor J, Schuldiner M, Karsenti D, Eden A, Yanuka O, Amit M, et al. Differentiation of human embryonic stem cells into embryoid bodies compromising the three embryonic germ layers. *Mol Med*. 2000;6:88–95.
15. Marcucio RS, Nauth A, Giannoudis PV, Bahney C, Piuze NS, Muschler G, et al. Stem cell therapies in orthopaedic trauma. *J Orthop Trauma*. 2015;29 Suppl 12:S24–7.
16. Chahla J, Piuze NS, Mitchell JJ, Dean CS, Pascual-Garrido C, LaPrade RF, et al. Intra-articular cellular therapy for osteoarthritis and focal cartilage defects of the knee: A systematic review of the literature and study quality analysis. *J Bone Joint Surg (Am)*. 2016;98:1511–21.
17. Ashton BA, Allen TD, Howlett CR, Eaglesom CC, Hattori A, Owen M, et al. Formation of bone and cartilage by marrow stromal cells in diffusion chambers in vivo. *Clin Orthop Relat Res*. 1980;151:294–307.
18. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*. 1998;282:1145–7.
19. Shamblott MJ, Axelman J, Wang S, Bugg EM, Littlefield JW, Donovan PJ, et al. Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998;95:13726–31.
20. Hirzinger C, Tauber M, Kornthner S, Quirchmayr M, Bauer HC, Traweger A, et al. ACL injuries and stem cell therapy. *Arch Orthop Trauma Surg*. 2014;134:1573–8.
21. Lodi D, Iannitti T, Palmieri B. Stem cells in clinical practice: Applications and warnings. *J Exp Clin Cancer Res*. 2011;30:9.
22. Hynes K, Menicanin D, Mrozik K, Gronthos S, Bartold PM. Generation of functional mesenchymal stem cells from different induced pluripotent stem cell lines. *Stem Cells Dev*. 2014;23:1084–96.
23. Cui P, He X, Pu Y, Zhang W, Zhang P, Li C, et al. Biological characterization and pluripotent identification of sheep dermis-derived mesenchymal stem/progenitor cells. *Biomed Res Int*. 2014;2014:786234.
24. Takahashi K, Okita K, Nakagawa M, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from fibroblast cultures. *Nat Protoc*. 2007;2:3081–9.
25. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. 2007;131:861–72.
26. Gonzalez F, Boue S, Izpisua Belmonte JC. Methods for making induced pluripotent stem cells: Reprogramming a la carte. *Nat Rev Genet*. 2011;12:231–42.
27. Centeno CJ, Schultz JR, Cheever M, Freeman M, Faulkner S, Robinson B, et al. Safety and complications reporting update on the re-implantation of culture-expanded mesenchymal stem cells using autologous platelet lysate technique. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2011;6:368–78.
28. Muschler GF, Midura RJ. Connective tissue progenitors: Practical concepts for clinical applications. *Clin Orthop Relat Res*. 2002;395:66–80.
29. Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res*. 1991;9:641–50.
30. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999;284:143–7.
31. Liu H, Toh WS, Lu K, MacAry PA, Kemeny DM, Cao T. A subpopulation of mesenchymal stromal cells with high osteogenic potential. *J Cell Mol Med*. 2009;13:2436–47.
32. Wakitani S, Goto T, Pineda SJ, Young RG, Mansour JM, Caplan AI, et al. Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg (Am)*. 1994;76-A:579–92.
33. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy*. 2006;8:315–7.
34. Arufe MC, de la Fuente A, Fuentes I, de Toro FJ, Blanco FJ, et al. Chondrogenic potential of subpopulations of cells expressing mesenchymal stem cell markers derived from human synovial membranes. *J Cell Biochem*. 2010;111:834–45.
35. Yoshimura H, Muneta T, Nimura A, Yokoyama A, Koga H, Sekiya I. Comparison of rat mesenchymal stem cells derived from bone marrow, synovium, periosteum, adipose tissue, and muscle. *Cell Tissue Res*. 2007;327:449–62.
36. Jin D, Piper JA, Leif RC, Yang S, Ferrari BC, Yuan J, et al. Time-gated flow cytometry: An ultra-high selectivity method to recover ultra-rare-event mu-targets in high-background biosamples. *J Biomed Opt*. 2009;14:024023.
37. Arufe MC, de la Fuente A, Fuentes-Boquete I, de Toro FJ, Blanco FJ. Differentiation of synovial CD-105(+) human mesenchymal stem cells into chondrocyte-like cells through spheroid formation. *J Cell Biochem*. 2009;108:145–55.
38. Tew SR, Murdoch AD, Rauchenberg RP, Hardingham TE. Cellular methods in cartilage research: Primary human chondrocytes in culture and chondrogenesis in human bone marrow stem cells. *Methods*. 2008;45:2–9.
39. Vangsness CT, Sternberg H, Harris L. Umbilical cord tissue offers the greatest number of harvestable mesenchymal stem cells for research and clinical application: A literature review of different harvest sites. *Arthroscopy*. 2015;31:1836–43.
40. Muschler GF, Boehm C, Easley K. Aspiration to obtain osteoblast progenitor cells from human bone marrow: The influence of aspiration volume. *J Bone Joint Surg (Am)*. 1997;79-A:1699–709.
41. Hopper N, Wardale J, Brooks R, Power J, Rushton N, Henson F. Peripheral blood mononuclear cells enhance cartilage repair in in vivo osteochondral defect model. *PLoS One*. 2015;10:0133937.
42. Jobin C, Cloutier M, Simard C, Néron S. Heterogeneity of in vitro-cultured CD34+ cells isolated from peripheral blood. *Cytotherapy*. 2015;17:1472–84.
43. Saw KY, Anz A, Merican S, Tay YG, Ragavanaidu K, Jee CS, et al. Articular cartilage regeneration with autologous peripheral blood progenitor cells and hyaluronic acid after arthroscopic subchondral drilling: A report of 5 cases with histology. *Arthroscopy*. 2011;27:493–506.
44. Hosang C, Saliba RM, Hamerschlak N, Kutner JM, Sakashita AM, Kondo AT, et al. Peripheral blood stem cell yield calculated using preapheresis absolute CD34+ cell count, peripheral blood volume processed, and donor body weight accurately predicts actual yield at multiple centers. *Transfusion*. 2014;54:1081–7.
45. Bourin P, Bunnell BA, Casteilla L, Dominici M, Katz AJ, March KL, et al. Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: A joint statement of the

- International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the International Society for Cellular Therapy (ISCT). *Cytotherapy*. 2013;15:641-8.
46. Stashower M, Smith K, Williams J, Skelton H. Stromal progenitor cells present within liposuction and reduction abdominoplasty fat for autologous transfer to aged skin. *Dermatol Surg*. 1999;25:945-9.
 47. Gronthos S, Franklin DM, Leddy HA, Robey PG, Storms RW, Gimble JM, et al. Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells. *J Cell Physiol*. 2001;189:54-63.
 48. McIntosh K, Zvonic S, Garrett S, Mitchell JB, Floyd ZE, Hammill L, et al. The immunogenicity of human adipose-derived cells: Temporal changes in vitro. *Stem Cells*. 2006;24:1246-53.
 49. Mitchell JB, McIntosh K, Zvonic S, Garrett S, Floyd ZE, Kloster A, et al. Immunophenotype of human adipose-derived cells: Temporal changes in stromal-associated and stem cell-associated markers. *Stem Cells*. 2006;24:376-85.
 50. Lo Surdo JL, Millis BA, Bauer SR. Automated microscopy as a quantitative method to measure differences in adipogenic differentiation in preparations of human mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy*. 2013;15:1527-40.
 51. ASTM F2944-12, standard test method for automated colony forming unit (CFU) assays —image acquisition and analysis method for enumerating and characterizing cells and colonies in culture. ASTM International, West Conshohocken, PA, 2012.
 52. Powell KA, Nakamoto C, Villarruel S, Boehm C, Muschler G. Quantitative image analysis of connective tissue progenitors. *Anal Quant Cytol Histol*. 2007;29:112-21.
 53. Koh YG, Kwon OR, Kim YS, Choi YJ. Comparative outcomes of open-wedge high tibial osteotomy with platelet-rich plasma alone or in combination with mesenchymal stem cell treatment: A prospective study. *Arthroscopy*. 2014;30:1453-60.
 54. Granero-Molto F, Weis JA, Miga MI, Landis B, Myers TJ, O'Rear L, et al. Regenerative effects of transplanted mesenchymal stem cells in fracture healing. *Stem Cells*. 2009;27:1887-98.
 55. Mosna F, Sensebe L, Krampera M. Human bone marrow and adipose tissue mesenchymal stem cells: A user's guide. *Stem Cells Dev*. 2010;19:1449-70.
 56. Nakamizo A, Marini F, Amano T, Khan A, Studeny M, Gumin J, et al. Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in the treatment of gliomas. *Cancer Res*. 2005;65:3307-18.
 57. Baghaban Eslaminejad M, Malakooty Poor E. Mesenchymal stem cells as a potent cell source for articular cartilage regeneration. *World J Stem Cells*. 2014;6:344-54.
 58. Honczarenko M, Le Y, Swierkowski M, Ghiran I, Glodek AM, Silberstein LE, et al. Human bone marrow stromal cells express a distinct set of biologically functional chemokine receptors. *Stem Cells*. 2006;24:1030-41.
 59. LaPrade RF, Geeslin AG, Murray IR, Musahl V, Zlotnicki JP, Petrigliano F, et al. Biologic treatments for sports injuries II think tank-current concepts, future research, and barriers to advancement. Part 1: Biologics overview, ligament injury, tendinopathy. *Am J Sports Med*. 2016 Mar 29, pii: 0363546516634674. [Epub ahead of print].
 60. Liu ZJ, Zhuge Y, Velazquez OC. Trafficking and differentiation of mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem*. 2009;106:984-91.
 61. 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;25:2739-49.
 62. Phinney DG, Prockop DJ. Concise review: Mesenchymal stem/multipotent stromal cells: The state of transdifferentiation and modes of tissue repair —current views. *Stem Cells*. 2007;25:2896-902.
 63. Parker AM, Katz AJ. Adipose-derived stem cells for the regeneration of damaged tissues. *Expert Opin Biol Ther*. 2006;6:567-78.
 64. Bakopoulou A, Leyhausen G, Volk J, Tsiftoglou A, Garefis P, Koidis P, et al. Comparative analysis of in vitro osteo/odontogenic differentiation potential of human dental pulp stem cells (DPSCs) and stem cells from the apical papilla (SCAP). *Arch Oral Biol*. 2011;56:709-21.
 65. Jankowski RJ, Deasy BM, Huard J. Muscle-derived stem cells. *Gene Ther*. 2002;9:642-7.
 66. Wickham MQ, Erickson GR, Gimble JM, Vail TP, Guilak F. Multipotent stromal cells derived from the infrapatellar fat pad of the knee. *Clin Orthop Relat Res*. 2003;412:196-212.
 67. Toh WS, Foldager CB, Pei M, Hui JH. Advances in mesenchymal stem cell-based strategies for cartilage repair and regeneration. *Stem Cell Rev*. 2014;10:686-96.
 68. Dragoo JL, Carlson G, McCormick F, Khan-Farooqi H, Zhu M, Zuk PA, et al. Healing full-thickness cartilage defects using adipose-derived stem cells. *Tissue Eng*. 2007;13:1615-21.
 69. Murray IR, West CC, Hardy WR, James AW, Park TS, Nguyen A, et al. Natural history of mesenchymal stem cells, from vessel walls to culture vessels. *Cell Mol Life Sci*. 2014;71:1353-74.
 70. Murray IR, Corselli M, Petrigliano FA, Soo C, Péault B. Recent insights into the identity of mesenchymal stem cells: Implications for orthopaedic applications. *Bone Joint J*. 2014;96-b:291-8.
 71. Johnstone B, Hering TM, Caplan AI, Goldberg VM, Yoo JU. In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Exp Cell Res*. 1998;238:265-72.
 72. Gimble JM, Katz AJ, Bunnell BA. Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circ Res*. 2007;100:1249-60.
 73. Estes BT, Wu AW, Guilak F. Potent induction of chondrocytic differentiation of human adipose-derived adult stem cells by bone morphogenetic protein 6. *Arthritis Rheum*. 2006;54:1222-32.
 74. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: Implications for cell-based therapies. *Tissue Eng*. 2001;7:211-28.
 75. Connolly JF. Injectable bone marrow preparations to stimulate osteogenic repair. *Clin Orthop Relat Res*. 1995;313:8-18.
 76. Hernigou P, Homma Y, Flouzat Lachaniette CH, Poignard A, Allain J, Chevallier N, et al. Benefits of small volume and small syringe for bone marrow aspirations of mesenchymal stem cells. *Int Orthop*. 2013;37:2279-87.
 77. Patterson TE, Kumagai K, Griffith L, Muschler GF. Cellular strategies for enhancement of fracture repair. *J Bone Joint Surg (Am)*. 2008;90-A Suppl 1:111-9.
 78. Muschler GF, Nitto H, Boehm CA, Easley KA. Age- and gender-related changes in the cellularity of human bone marrow and the prevalence of osteoblastic progenitors. *J Orthop Res*. 2001;19:117-25.
 79. Afizah H, Yang Z, Hui JH, Ouyang HW, Lee EH. A comparison between the chondrogenic potential of human bone marrow stem cells (BMSCs) and adipose-derived stem cells (ADSCs) taken from the same donors. *Tissue Eng*. 2007;13:659-66.
 80. Friedenstein AJ, Piatetzky S, Petrakova KV. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryol Exp Morphol*. 1966;16:381-90.
 81. Petrakova KV, Tolmacheva AA, Aia F. [Bone formation occurring in bone marrow transplantation in diffusion chambers]. *Biull Eksp Biol Med*. 1963;56:87-91.
 82. Marmotti A, de Girolamo L, Bonasia DE, Bruzzone M, Mattia S, Rossi R, et al. Bone marrow derived stem cells in joint

- and bone diseases: A concise review. *Int Orthop*. 2014;38:1787-801.
83. Adams MK, Goodrich LR, Rao S, Olea-Popelka F, Phillips N, Kisiday JD, et al. Equine bone marrow-derived mesenchymal stromal cells (BMDMSCs) from the ilium and sternum: Are there differences? *Equine Vet J*. 2013;45:372-5.
 84. Hernigou P, Mathieu G, Poignard A, Manicom O, Beaujean F, Rouard H, et al. Percutaneous autologous bone-marrow grafting for nonunions. Surgical technique. *J Bone Joint Surg (Am)*. 2006;88 Suppl 1:322-7.
 85. Luangphakdy V, Boehm C, Pan H, Herrick J, Zaveri P, Muschler GF. Assessment of methods for rapid intraoperative concentration and selection of marrow-derived connective tissue progenitors for bone regeneration using the canine femoral multidefect model. *Tissue Eng Part A*. 2016;22:17-30.
 86. Chahla J, Dean CS, Moatshe G, Pascual-Garrido C, Serra Cruz R, LaPrade RF. Concentrated bone marrow aspirate for the treatment of chondral injuries and osteoarthritis of the knee: A systematic review of outcomes. *Orthop J Sports Med*. 2016;4: 2325967115625481.
 87. D'Ippolito G, Schiller PC, Ricordi C, Roos BA, Howard GA. Age-related osteogenic potential of mesenchymal stromal stem cells from human vertebral bone marrow. *J Bone Miner Res*. 1999;14:1115-22.
 88. Majors AK, Boehm CA, Nitto H, Midura RJ, Muschler GF. Characterization of human bone marrow stromal cells with respect to osteoblastic differentiation. *J Orthop Res*. 1997;15:546-57.
 89. Lavasani M, Robinson AR, Lu A, Song M, Feduska JM, Ahani B, et al. Muscle-derived stem/progenitor cell dysfunction limits healthspan and lifespan in a murine progeria model. *Nat Commun*. 2012;3:608.
 90. Payne KA, Didiano DM, Chu CR. Donor sex and age influence the chondrogenic potential of human femoral bone marrow stem cells. *Osteoarthritis Cartilage*. 2010;18:705-13.
 91. Gimble JM, Robinson CE, Wu X, Kelly KA. The function of adipocytes in the bone marrow stroma: An update. *Bone*. 1996;19:421-8.
 92. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, de Ugarte DA, Huang JJ, Mizuno H, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell*. 2002;13:4279-95.
 93. Aust L, Devlin B, Foster SJ, Halvorsen YD, Hicok K, du Laney T, et al. Yield of human adipose-derived adult stem cells from liposuction aspirates. *Cytotherapy*. 2004;6:7-14.
 94. Dragoo JL, Samimi B, Zhu M, Hame SL, Thomas BJ, Lieberman JR, et al. Tissue-engineered cartilage and bone using stem cells from human infrapatellar fat pads. *J Bone Joint Surg (Br)*. 2003;85:740-7.
 95. Gimble J, Guilak F. Adipose-derived adult stem cells: Isolation, characterization, and differentiation potential. *Cytotherapy*. 2003;5:362-9.
 96. Hennig T, Lorenz H, Thiel G, Goetzke K, Dickhut A, Geiger F, et al. Reduced chondrogenic potential of adipose tissue derived stromal cells correlates with an altered TGFbeta receptor and BMP profile and is overcome by BMP-6. *J Cell Physiol*. 2007;211:682-91.
 97. Im GI, Shin YW, Lee KB. Do adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have the same osteogenic and chondrogenic potential as bone marrow-derived cells? *Osteoarthritis Cartilage*. 2005;13:845-53.
 98. Huang JJ, Kazmi N, Durbhakula MM, Hering TM, Yoo JU, Johnstone B, et al. Chondrogenic potential of progenitor cells derived from human bone marrow and adipose tissue: A patient-matched comparison. *J Orthop Res*. 2005;23:1383-9.
 99. Winter A, Breit S, Parsch D, Benz K, Steck E, Hauner H, et al. Cartilage-like gene expression in differentiated human stem cell spheroids: A comparison of bone marrow-derived and adipose tissue-derived stromal cells. *Arthritis Rheum*. 2003;48:418-29.
 100. Choi YS, Vincent LG, Lee AR, Dobke MK, Engler AJ. Mechanical derivation of functional myotubes from adipose-derived stem cells. *Biomaterials*. 2012;33:2482-91.
 101. Schipper BM, Marra KG, Zhang W, Donnenberg AD, Rubin JP. Regional anatomic and age effects on cell function of human adipose-derived stem cells. *Ann Plast Surg*. 2008;60:538-44.
 102. Cawthorn WP, Scheller EL, MacDougald OA. Adipose tissue stem cells meet preadipocyte commitment: Going back to the future. *J Lipid Res*. 2012;53:227-46.
 103. Han J, Koh YJ, Moon HR, Ryoo HG, Cho CH, Kim I, et al. Adipose tissue is an extramedullary reservoir for functional hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood*. 2010;115:957-64.
 104. Oedayrajsingh-Varma MJ, van Ham SM, Knippenberg M, Helder MN, Klein-Nulend J, Schouten TE, et al. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cell yield and growth characteristics are affected by the tissue-harvesting procedure. *Cytotherapy*. 2006;8:166-77.
 105. Yoshimura K, Shigeura T, Matsumoto D, Sato T, Takaki Y, Aiba-Kojima E, et al. Characterization of freshly isolated and cultured cells derived from the fatty and fluid portions of liposuction aspirates. *J Cell Physiol*. 2006;208:64-76.
 106. Williams SK, Wang TF, Castrillo R, Jarrell BE. Liposuction-derived human fat used for vascular graft sodding contains endothelial cells and not mesothelial cells as the major cell type. *J Vasc Surg*. 1994;19:916-23.
 107. Katz AJ, Tholpady A, Tholpady SS, Shang H, Ogle RC. Cell surface and transcriptional characterization of human adipose-derived adherent stromal (hADAS) cells. *Stem Cells*. 2005;23:412-23.
 108. Jones BA, Pei M. Synovium-derived stem cells: A tissue-specific stem cell for cartilage engineering and regeneration. *Tissue Eng Part B Rev*. 2012;18:301-11.
 109. Shirasawa S, Sekiya I, Sakaguchi Y, Yagishita K, Ichinose S, Muneta T. In vitro chondrogenesis of human synovium-derived mesenchymal stem cells: Optimal condition and comparison with bone marrow-derived cells. *J Cell Biochem*. 2006;97:84-97.
 110. Sakaguchi Y, Sekiya I, Yagishita K, Muneta T. Comparison of human stem cells derived from various mesenchymal tissues: Superiority of synovium as a cell source. *Arthritis Rheum*. 2005;52:2521-9.
 111. Sekiya I, Muneta T, Horie M, Koga H. Arthroscopic transplantation of synovial stem cells improves clinical outcomes in knees with cartilage defects. *Clin Orthop Relat Res*. 2015;473:2316-26.
 112. Kuwana M, Okazaki Y, Kodama H, Izumi K, Yasuoka H, Ogawa Y, et al. Human circulating CD14+ monocytes as a source of progenitors that exhibit mesenchymal cell differentiation. *J Leukoc Biol*. 2003;74:833-45.
 113. Bucala R, Spiegel LA, Chesney J, Hogan M, Cerami A. Circulating fibrocytes define a new leukocyte subpopulation that mediates tissue repair. *Mol Med*. 1994;1:71-81.
 114. Zhao Y, Glesne D, Huberman E. A human peripheral blood monocyte-derived subset acts as pluripotent stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100:2426-31.
 115. Kodama H, Inoue T, Watanabe R, Yasuoka H, Kawakami Y, Ogawa S, et al. Cardiomyogenic potential of mesenchymal progenitors derived from human circulating CD14+ monocytes. *Stem Cells Dev*. 2005;14:676-86.
 116. Kuznetsov SA, Mankani MH, Leet AI, Ziran N, Gronthos S, Robey PG. Circulating connective tissue precursors: Extreme rarity in humans and chondrogenic potential in guinea pigs. *Stem Cells*. 2007;25:1830-9.
 117. Saw KY, Anz A, Siew-Yoke Jee C, Merican S, Ching-Soong Ng R, Roohi SA, et al. Articular cartilage regeneration with

- autologous peripheral blood stem cells versus hyaluronic acid: A randomized controlled trial. *Arthroscopy*. 2013;29:684-94.
118. Saw KY, Anz A, Jee CS, Ng RC, Mohtarrudin N, Ragavanaidu K. High tibial osteotomy in combination with chondrogenesis after stem cell therapy: A histologic report of 8 cases. *Arthroscopy*. 2015;31:1909-20.
119. Fatorova I, Blaha M, Lanska M, Vokurkova D, Rezacova V, Zak P. Timing of peripheral blood stem cell yield: Comparison of alternative methods with the classic method for CD34+ cell determination. *Biomed Res Int*. 2014;2014:575368.
120. Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol*. 2005;5:953-64.
121. Hopper N, Wardale J, Howard D, Brooks R, Rushton N, Henson F. Peripheral blood derived mononuclear cells enhance the migration and chondrogenic differentiation of multipotent mesenchymal stromal cells. *Stem Cells Int*. 2015;2015:323454.
122. Krenning G, van der Strate BW, Schipper M, Brouwer LA, Fernandes BC, van Luyn MJ, et al. Combined implantation of CD34+ and CD14+ cells increases neovascularization through amplified paracrine signalling. *J Tissue Eng Regen Med*. 2013;7:118-28.
123. Geissmann F, Gordon S, Hume DA, Mowat AM, Randolph GJ. Unravelling mononuclear phagocyte heterogeneity. *Nat Rev Immunol*. 2010;10:453-60.
124. Reilkoff RA, Bucala R, Herzog EL. Fibrocytes: Emerging effector cells in chronic inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2011;11:427-35.
125. Fu WL, Zhou CY, Yu JK. A new source of mesenchymal stem cells for articular cartilage repair: MSCs derived from mobilized peripheral blood share similar biological characteristics in vitro and chondrogenesis in vivo as MSCs from bone marrow in a rabbit model. *Am J Sports Med*. 2014;42:592-601.
126. Fu WL, Zhang JY, Fu X, Duan XN, Leung KK, Jia ZQ, et al. Comparative study of the biological characteristics of mesenchymal stem cells from bone marrow and peripheral blood of rats. *Tissue Eng Part A*. 2012;18:1793-803.
127. Song F, Tang J, Geng R, Hu H, Zhu C, Cui W, et al. Comparison of the efficacy of bone marrow mononuclear cells and bone mesenchymal stem cells in the treatment of osteoarthritis in a sheep model. *Int J Clin Exp Pathol*. 2014;7:1415-26.
128. Zheng RC, Park YK, Kim SK, Cho J, Heo SJ, Koak JY, et al. Bone regeneration of blood-derived stem cells within dental implants. *J Dent Res*. 2015;94:1318-25.
129. Hunziker EB. Articular cartilage repair: Basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects. *Osteoarthritis Cartilage*. 2002;10:432-63.
130. Kim HK, Moran ME, Salter RB. The potential for regeneration of articular cartilage in defects created by chondral shaving and subchondral abrasion. An experimental investigation in rabbits. *J Bone Joint Surg (Am)*. 1991;73:1301-15.
131. Outerbridge RE. The etiology of chondromalacia patellae. 1961. *Clin Orthop Relat Res*. 2001;389:5-8.
132. Widuchowski W, Widuchowski J, Trzaska T. Articular cartilage defects: Study of 25,124 knee arthroscopies. *Knee*. 2007;14:177-82.
133. Frenkel SR, di Cesare PE. Degradation and repair of articular cartilage. *Front Biosci*. 1999;4:671-85.
134. Shelbourne KD, Jari S, Gray T. Outcome of untreated traumatic articular cartilage defects of the knee: A natural history study. *J Bone Joint Surg (Am)*. 2003;85-A Suppl 2:8-16.
135. Viste A, Piperno M, Desmarchelier R, Grosclaude S, Moyon B, Fessy MH. Autologous chondrocyte implantation for traumatic full-thickness cartilage defects of the knee in 14 patients: 6-year functional outcomes. *Orthop Traumatol Surg Res*. 2012;98:737-43.
136. Jiang YZ, Zhang SF, Qi YY, Wang LL, Ouyang HW. Cell transplantation for articular cartilage defects: Principles of past, present, and future practice. *Cell Transplant*. 2011;20:593-607.
137. Vijayan S, Bentley G, Briggs T, Skinner J, Carrington R, Pollock R, et al. Cartilage repair: A review of Stanmore experience in the treatment of osteochondral defects in the knee with various surgical techniques. *Indian J Orthop*. 2010;44:238-45.
138. Arden N, Nevitt NC. Osteoarthritis: Epidemiology. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2006;20:3-25.
139. Loeser RF, Goldring SR, Scanzello CR, Goldring MB. Osteoarthritis: A disease of the joint as an organ. *Arthritis Rheum*. 2012;64:1697-707.
140. Le Blanc K, Tammik C, Rosendahl K, Zetterberg E, Ringdén O. HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. *Exp Hematol*. 2003;31:890-6.
141. Chirba MA, Sweetapple B, Hannon CP, Anderson JA. FDA regulation of adult stem cell therapies as used in sports medicine. *J Knee Surg*. 2015;28:55-62.
142. Anz A. Current and future stem cell regulation: A call to action. *Am J Orthop*. 2016;45:274-8.
143. Vega A, Martín-Ferrero MA, del Canto F, Alberca M, García V, Munar A, et al. Treatment of knee osteoarthritis with allogeneic bone marrow mesenchymal stem cells: A randomized controlled trial. *Transplantation*. 2015;99:1681-90.
144. Koh YG, Choi YJ. Infrapatellar fat pad-derived mesenchymal stem cell therapy for knee osteoarthritis. *Knee*. 2012;19:902-7.
145. Wong KL, Lee KB, Tai BC, Law P, Lee EH, Hui JH. Injectable cultured bone marrow-derived mesenchymal stem cells in varus knees with cartilage defects undergoing high tibial osteotomy: A prospective, randomized controlled clinical trial with 2 years' follow-up. *Arthroscopy*. 2013;29:2020-8.
146. Skowronski J, Rutka M. Osteochondral lesions of the knee reconstructed with mesenchymal stem cells—results. *Orthop Traumatol Rehabil*. 2013;15:195-204.
147. Lee KB, Wang VT, Chan YH, Hui JH. A novel, minimally-invasive technique of cartilage repair in the human knee using arthroscopic microfracture and injections of mesenchymal stem cells and hyaluronic acid—a prospective comparative study on safety and short-term efficacy. *Ann Acad Med Singapore*. 2012;41:511-7.
148. LaPrade CM, Wang VT, Chan YH, Hui JH. How should we evaluate outcomes for use of biologics in the knee? *J Knee Surg*. 2015;28:35-44.
149. Kopka M, Bradley JP. The use of biologic agents in athletes with knee injuries. *J Knee Surg*. 2016;29:379-86.
150. McAlindon TE, Driban JB, Henrotin Y, Hunter DJ, Jiang GL, Skou ST, et al. OARSI Clinical Trials recommendations: Design, conduct, and reporting of clinical trials for knee osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 2015;23:747-60.
151. Losina E, Ranstam J, Collins JE, Schnitzer TJ, Katz JN. OARSI Clinical Trials Recommendations: Key analytic considerations in design, analysis, and reporting of randomized controlled trials in osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 2015;23:677-85.