



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Facultad de Ciencias de la Salud

Trabajo Fin de Grado

**Terapia celular como tratamiento alternativo a la
implantación de prótesis en pacientes**

Alumno: MARIA DEL ROSARIO MÁRQUEZ MAROTO

Tutor: Prof. D. Macarena Perán Quesada

Dpto: Anatomía

Mayo, 2014

ÍNDICE

1.- INTRODUCCIÓN.....	2
2.- OBJETIVO.....	3
3.-CARTÍLAGO ARTICULAR.....	3
3.1.- ¿QUÉ ES?	3
3.2.- DETERIORO DEL CARTÍLAGO	4
3.3.- ETIOLOGÍA DEL DETERIORO DEL CARTÍLAGO.....	5
Edad.....	5
Artrosis	7
4.- OPCIONES DE TRATAMIENTO	8
5.- CÉLULAS MADRE	9
5.1.- CÉLULAS MADRE ADULTAS	9
5.2.- MÉTODO DE AISLAMIENTO DE LAS CÉLULAS MADRE	10
5.3.- PRINCIPALES FUENTES DE CÉLULAS MADRE PARA LA REGENERACIÓN CONDRAL	11
Médula ósea	11
Tejido adiposo	11
Membrana sinovial.....	12
Células progenitoras de diferentes orígenes	12
5.4.- SOPORTES CELULARES TRIDIMENSIONALES	13
5.5.- ENRIQUECIMIENTO PLAQUETARIO	14
5.6.- TERAPIA CELULAR ENFOCADA A LA REGENERACIÓN DEL CARTÍLAGO.....	15
Tratamiento inyectivo	15
Tratamiento quirúrgico	17
5.7.- EFECTIVIDAD DE LAS CÉLULAS MADRE	18
6.- ESTIMULACIÓN MECÁNICA DE LAS CÉLULAS MADRE.....	20
7.- CONCLUSIÓN.....	20
8.- BIBLIOGRAFÍA.....	22

Resumen:

En esta revisión narrativa nos centraremos en las lesiones del cartílago y cómo el tratamiento con las células madre es una terapia alternativa a la implantación de prótesis de rodilla. Qué son, cómo se aíslan, cómo se inyectan, entre otras, será lo que veamos a lo largo de este trabajo. Además, se ha observado cómo la estimulación mecánica, el estiramiento y el estrés sobre las células madre aumenta su efectividad y su reproducción. Con ello podemos deducir que la acción del fisioterapeuta es esencial en la recuperación del paciente cuando se tratan dichas lesiones del cartílago mediante el uso de células madre.

Abstract:

In this narrative review we will focus on cartilage injuries and how treatment with stem cells is an alternative to the knee prosthesis implantation therapy. What are they, how isolated, how are injected, among others, will be what we see throughout this work. In addition, it was observed how mechanical stimulation, stretching and stress on stem cells increases their effectiveness and reproduction. With this we can deduce that the action of the physiotherapist is essential to patient recovery when these cartilage injuries are treated using stem cells.

1.- INTRODUCCIÓN

El cartílago articular es un tejido altamente especializado que se caracteriza por sus propiedades mecánicas. Se interpone entre dos superficies óseas y por sus propiedades de resistencia a las fuerzas de compresión y de elasticidad, permite el deslizamiento de dichas superficies gracias a un coeficiente de fricción extremadamente bajo. El cartílago es avascular, por lo que carece de inervación. Se nutre a partir de moléculas del líquido sinovial que atraviesan su superficie (Weissman IL, Anderson DJ, Gage F. Stem and progenitor cells: origins, phenotypes, lineage commitment, and transdifferentiations. *Annu RevCell Dev Biol* 2001; 17:387-403).

Debido a su escasa vascularización, cuando ocurre una lesión en dicho cartílago, el tejido es incapaz de repararse. En ese momento comienza el proceso de degeneración de cartílago y con ello su sintomatología: dolor, inflamación, limitación del movimiento y pérdida de la funcionalidad.

Existen diferentes tratamientos que pueden ayudar a paliar la enfermedad pero ninguno de ellos es capaz de reparar el tejido dañado. Hoy en día, la terapia celular está dando buenos resultados para poder resolver este gran problema que afecta a una gran parte de la población.

2.- OBJETIVO

El principal objetivo de este trabajo es profundizar en las alternativas que existen cuando ocurre una lesión del tejido cartilaginoso. Entre estas alternativas está el uso de las células madre. Se estudiará cómo el uso de células madre en las lesiones del cartílago produce efectos beneficiosos, disminuye los síntomas y provoca una regeneración el tejido dañado cuando se producen lesiones en el cartílago.

3.-CARTÍLAGO ARTICULAR

3.1.- ¿QUÉ ES?

El cartílago articular es un tejido conectivo que carece de inervación, vasos sanguíneos, linfáticos y membrana basal y se nutre a través del líquido sinovial. Se encuentra anclado al hueso subcondral y su principal función es disipar las cargas biomecánicas y minimizar las fuerzas a las que se someten los huesos que forman la articulación diartrodial (Hardingham 2004, 2010).

Se estructura en varias zonas laminares y está formado por condrocitos que se encuentran rodeados por la matriz extracelular (1). Los condrocitos articulares sintetizan, organizan y degradan la matriz extracelular, regulando de este modo sus propiedades estructurales y funcionales de acuerdo con las cargas aplicadas. Esta matriz cartilaginosa es rica en proteoglicanos (su principal componente) y fibrillas de colágeno compuestas por colágeno de tipo II, también por colágeno tipo VI, IX, XI, XIV y un número de macromoléculas adicionales, incluyendo la proteína de la matriz oligomérica del cartílago, proteína de enlace, decorina, fibromodulina, fibronectina y tenascina (2). El cartílago articular hialino normal contiene alrededor de 70 % -80 % de agua y está principalmente unido a los proteoglicanos. La región

basal del cartílago articular se caracteriza por el aumento de la densidad mineral. Esta capa de cartílago calcificado está estrechamente conectada con el hueso subcondral subyacente (3).

El agregano, un miembro de la familia de proteoglicanos de agregación, contiene una proteína central a la que se unen cadenas de sulfato de glucosaminoglucano de condroitina/sulfato de queratina (sGAG) formando una estructura con forma de “escobilla”, el cual se extiende por la matriz extracelular. Los iones cargados positivamente contrarrestan la elevada carga negativa de las cadenas sGAG y crean un gradiente osmótico para la entrada de agua, que junto con los componentes poliméricos de la matriz forma una especie de gel que permite al tejido resistir cargas de compresión. El aumento del volumen en el tejido se contrarresta gracias a una red organizada de colágeno tipo II específico del cartílago, que también proporciona resistencia a la tracción (4).

Las moléculas adicionales de la matriz, entre ellas el ácido hialurónico, proteínas de enlace, pequeños proteoglicanos ricos en leucina, proteoglicanos de la superficie celular, fibrillas de colágeno asociadas a triples hélices interrumpidas (colágenos FACIT) y glicoproteínas, proporcionan señales que inducen la actividad de los condrocitos durante el desarrollo y en el mantenimiento de la homeostasis del tejido. Por lo tanto, el cartílago articular tiene una arquitectura molecular compleja, en la que la disposición de los condrocitos y las moléculas de la matriz, las proporciones en las que se sintetizan y su formación dentro de cada zona le confiere propiedades biomecánicas resistentes. Son estas propiedades las que diferencian al cartílago articular de otras formas, tales como fibrocartílago y cartílago epifisario (5).

3.2.- DETERIORO DEL CARTÍLAGO

La capacidad funcional del cartílago articular como tejido que soporta cargas depende totalmente del mantenimiento e integridad de la estructura de la matriz y la disposición de sus componentes moleculares. En condiciones fisiológicas, la homeostasis del cartílago articular sano se mantiene por un equilibrio dinámico entre la síntesis y la degradación, que está controlada por factores de crecimiento anabólicos y citoquinas. Además, metaloproteinasas de la matriz (MMPs) y los inhibidores tisulares de las metaloproteinasas (TIMPs) actúan bajo la activación de genes para modular los niveles de proteínas dentro de la matriz. El desequilibrio entre la síntesis y la degradación da lugar a una pérdida lenta y progresiva de los componentes de la matriz y la degradación del tejido cartilaginoso (6).

Con las continuas agresiones patológicas, los factores catabólicos predominan frente a los mecanismos anabólicos y la matriz pierde parte de su funcionalidad. A medida que el cartílago se deteriora, el tejido adquiere una apariencia rugosa convirtiéndose claramente en tejido fibroso, de tal manera que las moléculas de la matriz se degradan y la integridad del tejido se pierde. Durante las últimas etapas de la lesión, el tejido cartilaginoso se erosiona por completo y queda expuesto el hueso subcondral (7).

La reparación natural del cartílago es muy limitada, llegándose en algunos casos a crearse un tejido que, aunque comparte similitudes estructurales con el cartílago articular hialino, no presenta la misma organización de sus fibras ni una estratificación bien definida de sus condrocitos. Su composición bioquímica es más parecida al tejido fibroso que al cartílago hialino y su capacidad mecánica es significativamente inferior a la de este último.

Debido a la falta de vascularización en el cartílago articular, el acceso de las células progenitoras a la zona de la lesión condral se encuentra limitado. Por lo tanto, la lesión condral aparece repoblada por células que migran de la membrana sinovial. Sin embargo, la repoblación de estas células es insuficiente, y después de algunas semanas o meses, el tejido reparado comienza a degenerarse. Además, estas células se integran mal, causando discontinuidad y regiones con hipocelularidad y la formación de agrupaciones en el cartílago contiguo. Finalmente, las regiones contiguas se vuelven necróticas, dificultándose la reabsorción y la reparación.

3.3.- ETIOLOGÍA DEL DETERIORO DEL CARTÍLAGO

Son diversas las causas que pueden dar lugar al deterioro del cartílago, pero normalmente suele ser una combinación de varios factores lo que da lugar a la lesión.

Edad

El cartílago articular sufre cambios relacionados con la edad que aumentan el riesgo de degeneración que da lugar a la artrosis. Entre estos cambios está la fibrilación de la superficie articular, la disminución de las proteínas que conforman la matriz extracelular, el aumento del entrecruzamiento de colágeno y la pérdida de grosor que da lugar a una disminución de

resistencia a la tracción y aumento de rigidez; que pueden afectar a la auto-reparación del cartílago articular (8).

Estas alteraciones se deben principalmente al resultado del envejecimiento en la función de los condrocitos, que disminuyen la capacidad para mantener las características funcionales del tejido condral, incluyendo la disminución de la actividad sintética, síntesis de agreganos más irregulares y más pequeños, disminución de la funcionalidad de las proteínas de enlace y de la capacidad de respuesta a factores de crecimiento anabólicos. Además estos agreganos son menos sensibles a las citoquinas anabólicos y con el aumento de la edad el cartílago articular disminuye su capacidad de auto-reparación.

La causa de la pérdida de la función de los condrocitos relacionada con la edad se debe a un proceso de envejecimiento progresivo de los condrocitos del cartílago articular caracterizado por una disminución en la actividad mitótica, aumento de la expresión de la enzima beta-galactosidasa asociada al envejecimiento y la erosión de la longitud del telómero (8).

Las alteraciones en la agregación de proteoglicanos son uno de los mayores cambios que se producen en la matriz durante el envejecimiento. El tamaño de los agregados de proteoglucanos (moléculas formadas por la asociación no covalente de varios agreganos con un filamento ácido hialurónico) disminuye con la edad, debido a que las moléculas y sus cadenas de sulfato de condroitina se hacen más pequeñas, porque la media de los agreganos disminuye (9).

Algunos de estos cambios en los agregados se pueden deber a alteraciones relacionadas con la edad en la unión de las proteínas (pequeñas proteínas que estabilizan la asociación entre agreganos y ácido hialurónico). Otros cambios relacionados con la edad en la composición molecular y la estructura de la matriz del cartílago articular incluyen aumento de la reticulación del colágeno y disminución de la concentración de agua (9).

Por lo tanto, el envejecimiento del cartílago articular no causa artrosis pero da lugar a cambios en el cartílago articular que aumentan el riesgo de degeneración y disminuye la capacidad de los tejidos articulares de prevenir la progresión una vez que comienza la degeneración.

Artrosis

La artrosis es un proceso degenerativo del cartílago que afecta al sistema inmune, en el que se producen reacciones inflamatorias locales con la producción de citoquinas proinflamatorias (10). Tiene un gran impacto en la funcionalidad y la calidad de vida de los pacientes, así como una alta prevalencia en todo el mundo (11).

En el Reino Unido, entre 1,3 y 1,75 millones de personas tienen artrosis (12), mientras que en Francia, 6 millones de nuevos diagnóstico de artrosis se hacen cada año (13). En una encuesta de salud en 2000, el 10,2% y el 6,2% de la población española refirieron sintomatología de artrosis de rodilla y mano respectivamente (14).

Recientemente, se ha estimado que entre los adultos estadounidenses, aproximadamente 27 millones tiene artrosis. Además, la prevalencia de artrosis se espera que aumente en los próximos años en países desarrollados, ya que la esperanza de vida también está aumentando y la artrosis con mayor frecuencia afecta a las personas mayores (15).

Por otro lado, es una enfermedad que afecta a hombres de entre más de 50 años, representando la segunda la segunda causa de discapacidad laboral (16).

También decir que es responsable de aproximadamente el 2 % de todos los gastos de salud pública y de los costes indirectos derivados de la disminución de la productividad (16).

La artrosis no sólo afecta al cartílago sino que también a todos los tejidos de la articulación (hueso subcondral y en menor grado a la membrana sinovial, ligamentos, tendones y músculos). Consiste en un proceso complejo en el que se asocian multitud de factores: edad, carga inapropiada, traumatismo, cambios bioquímicos y antecedentes. La artrosis también puede ser el resultado de una lesión previa de los tendones y ligamentos o tras una fractura intraarticular, que conduce a inestabilidad en la articulación y desgaste del cartílago articular (artrosis secundaria) (Patrick Orth, Driscoll SW, Ana Rey-Rico, Jagadeesh K Venkatesan, Henning Madry y Magali Cucchiari en su revisión Current perspectives in stem cell research for knee cartilage repair).

En la artrosis, la capacidad de reparación del cartílago articular se ve comprometida. Debido a que el tamaño crítico de la lesión del cartílago para repararse es 3 cm², (17) si ocurren lesiones mayores en la artrosis no se podrá completar la recuperación de la lesión. Por lo tanto, el deterioro del cartílago en la artrosis no se reparará y progresará con el tiempo.

4.- OPCIONES DE TRATAMIENTO

Como se ha visto hasta ahora, la degeneración del cartílago es un proceso lento e irreversible, es decir, que el daño que se produce en el cartílago no se puede reparar. Hoy en día, aún no existe ningún tratamiento que pueda frenar esta degeneración, sino que existen tratamientos que intentan paliar o mejorar la enfermedad.

Estos tratamientos van dirigidos a disminuir en la medida de lo posible la inflamación y el dolor del paciente para que pueda seguir realizando sus actividades cotidianas, pero son poco eficaces para retrasar la progresión de la enfermedad.

Por un lado tenemos un tratamiento conservador, en el que incluimos reducción de peso, ejercicios acuáticos, ejercicios fisioterapéuticos, termoterapia y ultrasonidos, entre otros (18).

En este apartado incluimos el tratamiento farmacológico, utilizando fármacos anti-inflamatorios no esteroideos, analgésicos opioides, corticosteroides intraarticulares o inyecciones de ácido hialurónico.

También añadiremos tratamientos como la visco-suplementación (es una opción terapéutica para la artrosis de rodilla en sujetos ancianos con dolor articular que no respondieron a analgésicos básicos y que no son candidatos a la cirugía) (19) la glucosamina y/o sulfato de condroitina (20), cirugía artroscópica (21) o acupuntura (22).

Por otro lado tenemos el tratamiento quirúrgico (perforación subcondral (23), microfractura (24) y la artroplastia de rodilla (25)), que recurriremos a él cuando todo lo anterior haya fallado y como último recurso.

Todas estas opciones de tratamiento, ya sean conservadoras o quirúrgicas no son capaces de restituir el tejido dañado. Para ello se están investigando nuevas alternativas de tratamiento, entre ellas el uso de células madre, el cual se está implantado en los últimos años por sus grandes beneficios. Esta terapia celular busca generar condrocitos para producir tejido cartilaginoso reduciendo el dolor, restaurando la función articular y retrasando la aparición de la degradación del cartílago y la intervención quirúrgica (Khan et al 2010; Roberts et al. 2011).

5.- CÉLULAS MADRE

Una célula madre o troncal es aquella capaz de diferenciarse en distintos tipos de células especializadas, no sólo morfológicamente sino también de una forma funcional. Al dividirse, por un lado dan lugar a una célula hija, que mantiene la indiferenciación. Por otro lado da lugar a una célula diferenciada o predispuesta a diferenciarse hacia una estirpe celular determinada (F Prosper, C. m verfaille).

Las células madre se pueden clasificar según su potencial de diferenciación en:

- Células madre totipotenciales, que son capaces de producir tejido embrionario y extraembrionario, siendo el cigoto la única célula totipotente.
- Células madre pluripotenciales, que tienen la habilidad de diferenciarse en tejidos procedentes de cualquiera de las tres capas embrionarias. En este apartado se encuentran las células embrionarias, las derivadas del embrión y las recientemente descritas: células madre de pluripotencialidad inducida o “iPSCs”.
- Células madre multipotenciales, que son capaces de diferenciarse en distintos tipos celulares procedentes de la misma capa embrionaria. Aquí se engloban las células madre adultas que se encuentran en todos los tejidos del organismo (Weissman IL, Anderson DJ, Gage F. Stem and progenitor cells: origins, phenotypes, lineage commitment, and transdifferentiations. Annu Rev Cell Dev Biol 2001; 17:387-403).

5.1.- CÉLULAS MADRE ADULTAS

Hoy en día las células madre adultas son las más utilizadas en la práctica clínica debido a su capacidad para diferenciarse en otras células, a su actividad inmunosupresora, su inmunogenicidad limitada y la relativa facilidad de crecimiento en cultivo (26). Además, las células madre adultas puede ser una fuente autóloga de células si son aisladas del propio paciente eliminando las preocupaciones que crea el rechazo inmunológico.

Las células madre mesenquimales son células pluripotentes que se encuentran en múltiples tejidos adultos humanos incluyendo la médula ósea, el tejido sinovial y el tejido adiposo. Puesto que derivan del mesodermo, son capaces de diferenciarse en hueso, cartílago, músculo y tejido adiposo (Szilvassy SJ. The biology of hematopoietic stem cells. *Arch Med Res* 2003; 34:446-460).

5.2.- MÉTODO DE AISLAMIENTO DE LAS CÉLULAS MADRE

El procedimiento que se realiza con las células madre es el siguiente: aislamiento de las células madre de tejidos adultos, su expansión in vitro y la transfusión al paciente. Esto significa que las células se aíslan, luego se colocan en diversos factores de crecimiento para incrementar su número durante un período de varias semanas en un cultivo y luego son transferidas al paciente.

El método más común de aislar las células madre mesenquimales de tejidos como el adiposo o la médula ósea es aprovechando sus características fundamentales, que se lleva a cabo gracias a su alta adherencia al plástico. Tras un proceso de centrifugación selectivo en ficoll, las células se siembran en frascos de cultivo de plástico. Las células madre crecerán sobre esta superficie, mientras que otras poblaciones celulares, como es el caso de restos de células nucleadas no lo hará (27).

En cultivo las células madre crecen formando una monocapa y son mantenidas mediante la adición de factores de crecimiento que se les suministran a través de un medio de cultivo. La temperatura, humedad y contenido de CO₂ se mantiene en unos valores determinados a través de estufas de cultivo. Cada cierto tiempo las células deben de ser separadas del plástico por medio de la enzima tripsina y divididas, ya que la confluencia celular termina por degenerar el cultivo y las células acaban muriendo. Esto se conoce como “pase”. Tras cultivarlas, se divide la población de células de cada frasco celular en varios frascos, con lo que se disminuye su confluencia y se potencia su división (28).

5.3.- PRINCIPALES FUENTES DE CÉLULAS MADRE PARA LA REGENERACIÓN CONDRAL

La falta de antígenos de HLA de clase II, así como moléculas coestimuladoras como CD80 y CD81, son el principal elemento de la baja inmunogenicidad de las células madre. Por lo tanto, debido a su potencial inmunosupresor/inmunomoduladores de las células madre juegan un papel estimulante, como una fábrica de células en los tejidos lesionados e inflamados, regulan la baja reactividad de las células inmunes activadas y reducen el daño del tejido. Las células madre mesenquimales promueven la reparación de tejidos diferenciándose en distintos tipos de células dañadas, compensando su pérdida y segregando factores tróficos.

Las células se pueden obtener de todos los tejidos del organismo, aunque las principales fuentes, por ser las más extendidas son:

Médula ósea

Las células madre derivadas de médula ósea han sido un foco de investigación debido a su relativa facilidad de aislamiento, expansión y su alto potencial de diferenciación. La condrogénesis se ha logrado en cultivos de alta densidad en presencia de un medio que incluye dexametasona y la transformación de factor de crecimiento beta (TGF - β) (29). Sin embargo, existe una relación inversa entre la edad y el potencial de diferenciación de las células madre derivadas de médula ósea, que supone un reto para su aplicación en pacientes de edad avanzada (30).

Tejido adiposo

El tejido adiposo ha sido también una fuente importante de células madre mesenquimales. En comparación con las derivadas de médula ósea, las células madre derivadas de tejido adiposo de lipoaspirados se adquieren mediante un procedimiento menos invasivo y en cantidades mayores. Estas células se pueden transformarse en células condrogénicas, osteogénicas, adipogénicas, miogénicas y neurogénicas, aunque muestran algunas diferencias con las que derivadas de la médula ósea (31).

Las células madre derivadas de tejido adiposo son más pequeñas, pueden someterse a un mayor número de divisiones antes de envejecer y presentan mejores tasas de proliferación. Pueden diferenciarse mediante TGF- β o proteína morfogenética ósea 6 (BMP6). Estas células

se han empleado con éxito para las lesiones de cartílago y artrosis en vivo, obteniendo buenos resultados para la reparación del cartílago (32).

Membrana sinovial

Las células madre derivadas de la membrana sinovial se extraen a través de artroscopia de una forma poco invasiva y con mínimas complicaciones en la zona. Estas células madre tienen mayor capacidad proliferativa y condrogénica que otras, especialmente cuando se incuban con BMP. Sin embargo, muchas cuestiones deben abordarse en relación con el valor de estas células derivadas de la membrana sinovial debido a que existe una cierta persistencia de características fibroblásticas y la inducción de los perfiles de expresión génica hipertrófica en el compromiso condrogénico (33).

Células progenitoras de diferentes orígenes

Las células madre también se pueden aislar a partir del periostio, hueso trabecular, sangre del cordón umbilical, líquido amniótico, gelatina de Wharton y músculo esquelético.

Las células madre progenitoras del periostio (34) y de sangre del cordón umbilical (35) pueden ser inducidas para producir condrocitos en presencia de TGF - β . Las células madre mesenquimales progenitoras del periostio se han aplicado con éxito para reparar lesiones de cartílago en vivo. Sin embargo, mientras que las células madre mesenquimales progenitoras del periostio son fenotípicamente estables y se expanden fácilmente en cultivos, su uso está limitado por la disponibilidad reducida de material donante y la complejidad del procedimiento quirúrgico de extracción. La sangre del cordón umbilical en comparación con la médula ósea o tejido adiposo, posee una capacidad de aislamiento inferior pero su expansión es mayor. Hay que tener en cuenta que la administración de estas células no permite la reparación apropiada de las lesiones del cartílago en modelos animales, mientras que provoca la activación de una reacción inflamatoria en el sinovio (36).

Las células madre derivadas de músculo tienen una gran capacidad para diferenciarse, similar a las derivadas de médula ósea. Las evaluaciones en vivo revelaron que las células madre derivadas de músculo son las que mayor potencial presentan para reparar las lesiones del cartílago. Por lo tanto, su capacidad depende del sexo (las células madre derivadas del músculo masculino tienen mayor potencial de diferenciación condrogénica y de regeneración del cartílago) (37).

Las células madre derivadas de sangre periférica se consideran una fuente alternativa de células para el trasplante debido a la facilidad para cultivarse, su potencial de diferenciación y su implantación para la reparación de lesiones del cartílago en vivo. Cabe destacar que la investigación en la búsqueda de otros tipos de células progenitoras para la reparación del cartílago está en curso, incluyendo el trabajo con células madre embrionarias y células madre pluripotentes inducidas. Las células madre embrionarias y células madre pluripotentes inducidas pueden proporcionar una gran fuente de células universales sin límite y con capacidades reparadoras y regenerativas para las lesiones del cartílago, ya que tienen un potencial de proliferación indefinido y pueden inducir a la diferenciación de condrocitos (38).

Las células madre embrionarias se han utilizado para mejorar las lesiones del cartílago en vivo y para permitir la producción de una matriz de cartílago capaz de integrar las lesiones del cartílago. Por otro lado, el uso de células madre embrionarias sigue siendo cuestionado por razones éticas a causa de la recolección de las células a partir de embriones humanos y a los problemas de seguridad debido a que su uso se asocia con problemas de rechazo inmunológico y con la formación de teratomas (39).

Las células madre pluripotentes inducidas se pueden generar a partir de las propias células somáticas del paciente. Normalmente se generan por la reprogramación de células diferenciadas como los fibroblastos por transferencia de genes de múltiples factores de transcripción o el uso de métodos químicos (40). Hasta el momento, las células madre pluripotentes inducidas se han aplicado a modelos de lesiones del cartílago in vitro, lo que lleva a la producción y la integración de una matriz de cartílago adaptada biomecánica y estructuralmente. Hay que tener en cuenta que existen importantes desafíos relacionados con el uso clínico de las células madre pluripotentes inducidas, incluidos los riesgos de formación de teratomas y tumorigénesis (mutagénesis de inserción) de los vectores retrovirales que liberan genes de reprogramación (entre los cuales está el factor Myc oncogénica) (41).

5.4.- SOPORTES CELULARES TRIDIMENSIONALES

Los nuevos tratamientos orientados para la reparación del cartílago de la rodilla consisten en el uso de dispositivos que proporcionan un entorno tridimensional para guiar a las células y facilitar el crecimiento en un tejido lesionado. Una ventaja importante del uso de estructuras 3D para transferir las células (además de contener a las células implantadas dentro de la

lesión) es que los biomateriales pueden actuar como barreras para la invasión de fibroblastos del injerto fibroso que de otro modo podría interferir en la reparación (42).

Estos soportes deben de construirse con materiales que sean biocompatibles y biodegradables. Hasta la fecha, entre los biomateriales utilizados para transferir las células madre a pacientes con lesiones de cartílago o artrosis, destacan hidrogeles y soportes sólidos a base de polímeros naturales. Los hidrogeles son redes poliméricas que consisten en polímeros hidrófilos reticulados con buena biocompatibilidad, alta permeabilidad para el oxígeno y nutrientes y facilidad de encapsulación de células (43); lo que da lugar a una distribución uniforme.

El ácido hialurónico se ha utilizado debido a su presencia natural en la matriz extracelular y su papel fundamental en la homeostasis del cartílago (44). Biomateriales a base de colágeno también se han aplicado ampliamente para la regeneración del cartílago debido a la fuerza y la estabilidad de esta proteína en la matriz. Pueden ser procesados como geles, membranas, esponjas o espumas, siendo sometidos a la degradación enzimática.

Alternativamente, los soportes porosos sólidos tridimensionales tales como cerámicas pueden conferir estabilidad mecánica inmediatamente después de la implantación, proporcionando un soporte para mantener el crecimiento del tejido cartilaginoso y reparar el llenado de las lesiones (45).

Sin embargo, la pobre integración de los diferentes biomateriales con el cartílago que rodea sigue siendo un problema clave que debe resolverse para permitir la continuidad entre el cartílago recién formado y el nativo, la curación a largo plazo y la competencia biomecánica (45).

5.5.- ENRIQUECIMIENTO PLAQUETARIO

Cuando ocurre una lesión tisular, nuestro organismo responde mediante un complejo de señales en cascada celulares y no celulares que activan los receptores plaquetarios, dando como resultado una expulsión de factores de crecimiento en el lugar de la lesión. Este proceso se inicia con una proliferación celular y una respuesta de reparación del tejido. Uno de los principales factores desencadenantes que producen la activación de las plaquetas es la

proteína trombina; que ha demostrado que induce la liberación del factor de crecimiento plaquetario inmediato in vitro dependiendo de la dosis (46).

Lo primero que se debe de realizar es aislar la sangre, más conocida como plasma rico en plaquetas (PRP), el cual contiene una alta concentración de factores de crecimiento autólogos.

Una vez en el laboratorio, los glóbulos rojos se separan del plasma rico en plaquetas, que normalmente contiene un hematocrito por debajo del 5%. Los productos del plasma rico en plaquetas centrifugados habitualmente tienen la capacidad de producir entre 4 y 7 veces más de concentración de plaquetas en comparación con la sangre total.

Una vez activado por la trombina, el plasma rico en plaquetas se denomina gel plaquetario (PG), debido a la iniciación de las vías de coagulación medidas por el suero de fibrina.

Por vía cutánea, el plasma rico en plaquetas se puede implantar en el tejido con trombina autóloga a través de una técnica de inyección doble lumen. Alternativamente, el plasma rico en plaquetas se puede activar por la trombina in vitro para producir una menor viscosidad de las plaquetas lisado (PL), que contienen factores de crecimiento sin tejido plaquetario o matriz de fibrina. Las plaquetas lisadas se han utilizado con éxito como un aditivo de cultivo celular para facilitar el crecimiento y la diferenciación de las células madre mesenquimales autólogas (47).

5.6.- TERAPIA CELULAR ENFOCADA A LA REGENERACIÓN DEL CARTÍLAGO

Los tratamientos con células madre se pueden realizar de dos formas diferentes: mediante una inyección intraarticular o mediante artrotomía quirúrgica trasplantando las células madre al lugar de la lesión.

Tratamiento inyectivo

Esta técnica implica la administración de una suspensión que contiene células madre terapéuticamente activas mediante una inyección intraarticular. Este método es fácil de realizar, ya que es menos invasivo y adecuado para pacientes ambulatorios. Además, los riesgos asociados con inyecciones de células madre son menos graves en comparación con un tratamiento quirúrgico.

Por otro lado, la implantación de las células utilizando estas inyecciones no puede llegar al lugar de la lesión y las células pueden injertarse y poblar otros tejidos que no nos interesan. Además las inyecciones pueden tener más valor para tratamientos como la degeneración del cartílago articular generalizado, como es el caso de la artrosis.

Ejemplos de tratamientos inyectivos con células madre:

Las inyecciones Intra-articulares de células madre para el tratamiento clínico de las lesiones focales hasta ahora sólo han sido investigadas en relación con los procedimientos de estimulación de la médula, basados en el uso de las células madre derivadas de médula ósea y derivadas de sangre periférica (48). Numerosos ensayos clínicos han probado que la inyección de células madre aisladas derivadas de médula ósea o de aspirados de médula mediante desbridamiento artroscópico ha permitido la mejora en las puntuaciones analógicas visuales de la escala de dolor y la amplitud de movimiento, así como las puntuaciones en artrosis en pacientes de 6 a 12 meses después de la operación. Además, producen un aumento en el crecimiento del cartílago y el grosor con disminuciones en el tamaño de cartílago y el hueso subcondral edematoso.

Por ejemplo, en ensayos clínicos donde se realizaron inyecciones de células madre derivadas de médula ósea durante el tratamiento de microfracturas, se observaron mejoras significativas tanto en la movilidad como en la disminución del dolor en pacientes tras dos años de tratamiento y la resonancia magnética reveló un buen relleno de los defectos y de la integración del tejido de reparación.

Por otra parte, inyecciones semanales de células madre derivadas de sangre periférica revelaron la existencia de un tejido reparado, bien integrado de tipo fibrocartílago e hialino sin delaminación o hipertrofia después de 3 meses, en comparación con el tratamiento sólo con ácido hialurónico. Las evaluaciones con biopsias y escaneos de resonancia magnética después de 18 meses revelaron una mayor reparación del cartílago en presencia de las células madre derivadas de sangre periférica.

Por último también se ha comprobado la utilidad de la inyección de células madre derivadas de tejido adiposo utilizando plasma rico en plaquetas y el desbridamiento artroscópico o plasma rico en plaquetas con ácido hialurónico. Este tratamiento produjo buenos resultados clínicos tras 16 meses y 2 años post-tratamiento (49).

Tratamiento quirúrgico

El trasplante de células madre mediante un proceso quirúrgico requiere una artromía con exposición de la superficie articular. El trasplante quirúrgico de células madre en los defectos del cartílago se ha desarrollado en asociación con el uso de matrices o biomateriales; se diseñan soportes que permiten el crecimiento y mantenimiento celular. Estos son generalmente fabricados con colágeno e hidroxapatita cerámica recubiertas de ácido hialurónico. Estos soportes permiten la integración celular en la zona de cartílago dañada.

Este procedimiento, al ser más agresivo, ya que implicar una intervención quirúrgica, puede presentar una tasa de infección postoperatoria mayor en comparación con los tratamientos inyectivos y normalmente requiere varios días de estancia en el hospital. Aun así, permite la implantación de células de manera muy precisa en el lugar de la lesión. Por estas razones, la liberación quirúrgica de las células madre es más adecuada para el tratamiento de lesiones focales de la superficie de la articulación.

También cabe destacar que los dos tipos de procedimientos se pueden combinar con las opciones quirúrgicas empleadas actualmente para lesiones focales o generalizadas del cartílago, tales como el desbridamiento artroscópico, procedimientos de estimulación de la médula u osteotomías de descarga de la articulación lesionada. Es importante destacar que, y en contraste con el procedimiento de implantación de condrocitos autólogos en dos etapas convencionales, el trasplante de células madre puede ser diseñado como un protocolo de un solo paso, aunque bajo condiciones de preparación específicas (Patrick Orth, Ana Rey-Rico, Jagadeesh K Venkatesan, Henning Madry, Magali Cucchiari: Stem Cells and Cloning: Advances and Applications 2014:7).

Ejemplos de tratamientos quirúrgicos con células madre:

En los ejemplos de tratamientos quirúrgicos con células madre se ha observado que tras el trasplante con células derivadas de la médula ósea se produce la formación de un tejido de reparación de tipo hialino similar a la primera generación de la implantación de condrocitos autólogos y con los hallazgos de resonancia magnética que muestra las superficies con buen relleno de defectos y contornos correctos y la continuidad con el cartílago nativo, y sin cambios en el hueso subcondral (50).

Enfoques similares utilizando células madre aisladas derivadas de médula ósea o de la médula se concentra en ácido hialurónico; produjeron mejoras clínicas y subjetivas de los pacientes 2 años después de la operación. El buen estado subcondral y del cartílago se evaluó a través de la valoración de la resonancia magnética.

Alternativamente, el trasplante de células madre aisladas derivadas de médula ósea o de la médula se concentra en elementos derivados de colágeno (gel, soportes, membrana, matriz) condujo a mejores resultados clínicos en los pacientes de entre 6 meses y 5 años después de la operación. Se observó un buen relleno con la incorporación en el cartílago adyacente y la formación de un tejido de reparación de la naturaleza fibrocartilaginosa o incluso hialina.

5.7.- EFECTIVIDAD DE LAS CÉLULAS MADRE

Existen diversos estudios que han demostrado que las células madre mesenquimales son efectivas para la regeneración del cartílago. En primera instancia, se han realizado estudios en animales y una vez demostrada su efectividad se han probado en humanos. Estos tratamientos van dirigidos a la reparación del cartílago articular ocasionados por el paso del tiempo, debido a la artrosis, por una lesión que produce el daño en el cartílago; entre otros.

Se ha observado en los diferentes casos clínicos que los pacientes muestran disminución del dolor, aumento de la movilidad, en algunos casos reducción de la artrosis visible por RMN.

Hay que tener en cuenta que en los estudios realizados en humanos no se ha tenido en cuenta un grupo control y otro placebo, por lo que no podemos verificar la fiabilidad de la implantación de estas células. Para finalizar, se requieren estudios más fiables y mucho más complejos, utilizando grupos control.

Los estudios analizados son los siguientes:

1.- En un primer estudio se incluyeron a 12 pacientes (6 hombres y 6 mujeres), con edades comprendidas entre 49+/-5 años. Fueron diagnosticados con grado I a IV de Kellgren y Lawrence para artrosis de rodilla derecha (n = 6) o izquierda (n = 6) por dos observadores diferentes. Todos los pacientes seleccionados no habían respondido al tratamiento conservador (físico y médico) durante al menos 6 meses y nueve de ellos habían sido sometidos a cirugía previa.

Tras la inyección intraarticular, se observó que a los 3 meses el dolor había disminuido significativamente seguido por una pequeña mejora progresiva adicional durante los siguientes 9 meses. La disminución del dolor asociado a actividades deportivas fue mucho más notable. Con esto podemos decir que la inyección produjo en los pacientes un gran efecto analgésico siendo menor en la mejora de la funcionalidad (Orozco et al: Treatment of Knee Osteoarthritis With Autologous Mesenchymal Stem Cells: A Pilot Study).

2.- Un segundo estudio fue realizado con cuatro pacientes con artrosis de rodilla, los cuales fueron tratados con inyección intraarticular de MSC autólogas.

Todos los pacientes presentaban sobrepeso. Se seleccionaron dos hombres de mediana edad (55 a 65 años, AA y HM) y dos mujeres de mediana edad (57 y 54 años, PZ y MS). Tenían artrosis bilateral moderada o severa de rodilla (dolor mecánico de rodillas, agravado con el movimiento o con subir escaleras, crepitación, restringido el rango de movimiento, limitación del movimiento de la articulación, signos de hipertrofia ósea de las epífisis y con resultados de rayos X en los que se aprecia un estrechamiento del espacio articular y formación de osteofitos).

Tras la inyección se observó una mejora en las actividades cotidianas como el hecho de subir escaleras, bajarlas, andar, entre otras. También se produjo una mejora en la funcionalidad de la articulación mejorando los rangos articulares y una disminución del dolor.

Solo se produjo una inyección y se cree que fue insuficiente porque los resultados fueron buenos pero no excelentes (Fereydoun DAVATCHI, Bahar SADEGHI ABDOLLAHI, Mandana MOHYEDDIN, Farhad SHAHRAM and Behrooz NIKBIN: Mesenchymal stem cell therapy for knee osteoarthritis. Preliminary report of four patients).

3.- El tercer caso sólo cuenta con un paciente, que lleva varios años con dolor en las rodillas, presentando más dolor en la rodilla izquierda que en la derecha atribuidos a múltiples heridas de paracaidismo y largas marchas con pesos pesados durante su servicio militar. El dolor es constante, diario, 3-7/10 en intensidad y se asocia con dolor varias veces al mes. Presentaba 3 cirugías artroscópicas, incluyendo microfractura en la rodilla derecha con 5 a 7 años de alivio transitorio. Su rodilla izquierda, sin embargo, no ha sido objeto de ninguna intervención quirúrgica.

Los resultados mostraron mediante resonancia magnética un aumento del volumen en el menisco y cartílago (Christopher J. Centeno, MD, Dan Busse MD, John Kisiday, PhD, Cristin Keohan¹, Michael Freeman, PhD, and David Karli, MD: Increased Knee Cartilage Volume in

Degenerative Joint Disease using Percutaneously Implanted, Autologous Mesenchymal Stem Cells).

6.- ESTIMULACIÓN MECÁNICA DE LAS CÉLULAS MADRE

Existen nuevas líneas de investigación que apuntan a que la estimulación mecánica de la células madre in vitro produce efectos beneficiosos sobre el tejido dañado. Tanto la estimulación mecánica, el estiramiento, la carga mecánica, el estrés mecánico, entre otros producen un aumento en la diferenciación de las células madre en otras células (O'Driscoll SW, Keely FW, Salter RB. Durability of regenerated articular cartilage produced by free autogenous periosteal grafts in major full-thickness defects in joint surfaces under the influence of continuous passive motion. A follow-up report at one year. J Bone Joint Surg Am. 1988; 70: 595–606).

Desde el punto de vista fisioterapéutico resulta un dato interesante, ya que si la estimulación en vez de ser inducida por una máquina fuera inducida por un/a fisioterapeuta se podrían obtener buenos o incluso mejores sobre la sintomatología y el estado del paciente en menos tiempo. Esto nos abre nuevos abanicos de posibilidades que centran al fisioterapeuta como una figura esencial en el proceso de recuperación del paciente ante una lesión cartilaginosa.

7.- CONCLUSIÓN

Como se puede observar existen pocos tratamientos efectivos cuando aparece una lesión del cartílago articular. El descubrimiento de las células madre ha supuesto un gran avance en el tratamiento de esta patología, sobre todo en determinados pacientes de edad media porque retrasa la utilización de medidas más invasivas, entre ellas las prótesis de rodilla.

A la larga este uso de células madre no sólo supone un beneficio para el paciente a nivel personal sino también a nivel de costes económicos para la sociedad.

En controversia la utilización de las células madre presenta algunos inconvenientes que es necesario destacar; por un lado numerosos científicos y parte de la sociedad no está de

acuerdo con el uso de células madre embrionarias por cuestiones éticas, morales y religiosas, produciendo un retraso en la investigación en este ámbito, sobre todo en España. Por otro lado, las inyecciones con células madre pueden invadir tejidos adyacentes dando lugar a un empeoramiento de los síntomas del paciente e incluso a enfermedades más graves.

En conclusión, considero que cuando un paciente presenta una lesión del cartílago articular su principal problema es el dolor. La principal función del fisioterapeuta es mitigar ese dolor y producir una mejora de la sintomatología del paciente. A través de la implantación de las células madre junto con un buen tratamiento fisioterápico podemos lograr este objetivo sin tener que recurrir a medias más extremas.

Cabe destacar que los tratamientos de fisioterapia que implican el movimiento de la zona dañada mediante un estímulo dirigido por el fisioterapeuta, podrían resultar beneficiosos para recuperaciones del tejido cartilaginoso. No obstante, aún se necesitan más estudios que corroboren esta hipótesis.

8.- BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Cucchiarini M, Madry H.: Gene therapy for cartilage defects. *J Gene Med.* 2005; 7(12):1495-1509, mencionado por Patrick Orth, Driscoll SW, Ana Rey-Rico, Jagadeesh K Venkatesan, Henning Madry y Magali Cucchiarini en su revisión Current perspectives in stem cell research for knee cartilage repair.
- 2.- Hunziker EB, Michel M, Studer D.: Ultrastructure of adult human articular cartilage matrix after cryotechnical processing. *Microsc Res Tech.* 1997; 37(4):271–284, mencionado por Patrick Orth, Driscoll SW, Ana Rey-Rico, Jagadeesh K Venkatesan, Henning Madry y Magali Cucchiarini en su revisión Current perspectives in stem cell research for knee cartilage repair.
- 3.- Orth P, Cucchiarini M, Kohn D, Madry H.: Alterations of the subchondral bone in osteochondral repair – translational data and clinical evidence. *Eur Cell Mater.* 2013; 25:299 - 316, mencionado por Patrick Orth, Driscoll SW, Ana Rey-Rico, Jagadeesh K Venkatesan, Henning Madry y Magali Cucchiarini en su revisión Current perspectives in stem cell research for knee cartilage repair.
- 4.- Hardingham&Fosang 1992; Hardingham 2004 Rachel A. Oldershaw, mencionado por Patrick Orth, Driscoll SW, Ana Rey-Rico, Jagadeesh K Venkatesan, Henning Madry y Magali Cucchiarini en su revisión Current perspectives in stem cell research for knee cartilage repair.
- 5.- Hardingham & Fosang 1992; Hardingham et al. 2006; Fosang & Beier 2011, mencionado por Rachel A. Oldershaw en su revisión Cell sources for the regeneration of articular cartilage: the past, the horizon and the future.
- 6.- Brew et al. 2000; Goldring& Marcu 2009; Sun 2010; Goldring et al. 2011; Leong et al. 2011^a, b; Rosa et al. 2011, mencionado por Rachel A. Oldershaw en su revisión Cell sources for the regeneration of articular cartilage: the past, the horizon and the future.
- 7.- Frenkel & Di Cesare 1999, mencionado por Rachel A. Oldershaw en su revisión Cell sources for the regeneration of articular cartilage: the past, the horizon and the future.
- 8.- James A. Martin, Ph.D., Joseph A. Buckwalter, M.D.: ROLES OF ARTICULAR CARTILAGE AGING AND CHONDROCYTE SENESENCE IN THE PATHOGENESIS OF OSTEOARTHRITIS.
- 9.- Buckwalter, J.A., Goldberg, V., Woo, S.L.-Y.: Musculoskeletal Soft-Tissue Aging: Impact on Mobility. American Academy of Orthopaedic Surgeons: Rosemont, IL, p 423, 1993, mencionado

por James A. Martin, Ph.D., Joseph A. Buckwalter, M.D.: ROLES OF ARTICULAR CARTILAGE AGING AND CHONDROCYTE SENESENCE IN THE PATHOGENESIS OF OSTEOARTHRITIS.

10.- Davatchi F (2006): Rheumatic diseases in the APLAR region. APLAR J Rheumatol 9, 5–10, mencionado por Fereydoun DAVATCHI, Bahar SADEGHI ABDOLLAHI, Mandana MOHYEDDIN, Farhad SHAHRAM and Behrooz NIKBIN: Mesenchymal stem cell therapy for knee osteoarthritis. Preliminary report of four patients en la revista International Journal of Rheumatic Diseases.

11.- Reginster JY. The prevalence and burden of arthritis [review]. Rheumatology (Oxford) 2002; 41 Suppl 1:3–6, mencionado por ESTIBALIZ LOZA, JUAN MIGUEL LOPEZ-GOMEZ, LYDIA ABASOLO, JESUS MAESE, LORETO CARMONA, ENRIQUE BATLLE-GUALDA AND THE ARTROCAD STUDY GROUP en su artículo Economic Burden of Knee and Hip Osteoarthritis in Spain.

12.- Watson M. Management of patients with osteoarthritis. Pharm J 1997; 259:296–7, mencionado por ESTIBALIZ LOZA, JUAN MIGUEL LOPEZ-GOMEZ, LYDIA ABASOLO, JESUS MAESE, LORETO CARMONA, ENRIQUE BATLLE-GUALDA AND THE ARTROCAD STUDY GROUP en su artículo Economic Burden of Knee and Hip Osteoarthritis in Spain.

13.- Levy E, Ferme A, Perocheau D, Bono I. Socioeconomic costs of osteoarthritis in France. Rev Rhum Ed Fr 1993; 60:63S–7S. In French, mencionado por mencionado por ESTIBALIZ LOZA, JUAN MIGUEL LOPEZ-GOMEZ, LYDIA ABASOLO, JESUS MAESE, LORETO CARMONA, ENRIQUE BATLLE-GUALDA AND THE ARTROCAD STUDY GROUP en su artículo Economic Burden of Knee and Hip Osteoarthritis in Spain.

14.- Carmona L, Ballina J, Gabriel R, Laffon A. The burden of musculoskeletal diseases in the general population of Spain: results from a national survey. Ann Rheum Dis 2001; 60: 1040–5, mencionado por ESTIBALIZ LOZA, JUAN MIGUEL LOPEZ-GOMEZ, LYDIA ABASOLO, JESUS MAESE, LORETO CARMONA, ENRIQUE BATLLE-GUALDA AND THE ARTROCAD STUDY GROUP en su artículo Economic Burden of Knee and Hip Osteoarthritis in Spain .

15.- Lawrence RC, Felson DT, Helmick CG, Arnold LM, Choi H, Deyo RA, et al. Estimates of the prevalence of arthritis and other rheumatic conditions in the United States: part II. Arthritis Rheum 2008; 58:26–35, mencionado por ESTIBALIZ LOZA, JUAN MIGUEL LOPEZ-GOMEZ, LYDIA ABASOLO, JESUS MAESE, LORETO CARMONA, ENRIQUE BATLLE-GUALDA AND THE ARTROCAD STUDY GROUP en su artículo Economic Burden of Knee and Hip Osteoarthritis in Spain.

16.- Le Pen C, Reygrobelle C, Gerentes I. Financial cost of osteoarthritis in France. The "COART" France study. *Joint Bone Spine* 2005; 72: 567, mencionado por Lluís Orozco, Anna Munar, Robert Soler, Mercedes Alberca, Francesc Soler, Marina Huguet, Joan Senti's, Ana Sánchez, and Javier García-Sancho: Treatment of Knee Osteoarthritis With Autologous Mesenchymal Stem Cells: A Pilot Study.

17.- Hunziker EB.: Articular cartilage repair: basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects. *Osteoarthritis Cartilage*. 2002; 10(6):432–463, mencionado por Patrick Orth, Driscoll SW, Ana Rey-Rico, Jagadeesh K Venkatesan, Henning Madry y Magali Cucchiari en su revisión Current perspectives in stem cell research for knee cartilage repair.

18.- Rutjes AW, Nuesch E, Sterchi R, et al. Therapeutic ultrasound for osteoarthritis of the knee or hip. *Cochrane Database Syst Rev* 2010; CD003132, mencionado por Lluís Orozco, Anna Munar, Robert Soler, Mercedes Alberca, Francesc Soler, Marina Huguet, Joan Senti's, Ana Sánchez, and Javier García-Sancho: Treatment of Knee Osteoarthritis With Autologous Mesenchymal Stem Cells: A Pilot Study.

19.- Rutjes AW, Juni P, da Costa BR, et al. Viscosupplementation for osteoarthritis of the knee: a systematic review and meta analysis. *Ann Intern Med* 2012; 157: 180), mencionado por Lluís Orozco, Anna Munar, Robert Soler, Mercedes Alberca, Francesc Soler, Marina Huguet, Joan Senti's, Ana Sánchez, and Javier García-Sancho: Treatment of Knee Osteoarthritis With Autologous Mesenchymal Stem Cells: A Pilot Study.

20.- Sawitzke AD, Shi H, Finco MF, et al. Clinical efficacy and safety of glucosamine, chondroitin sulphate, their combination, celecoxib or placebo taken to treat osteoarthritis of the knee: 2-year results from GAIT. *Ann Rheum Dis* 2010; 69: 1459, mencionado por Lluís Orozco, Anna Munar, Robert Soler, Mercedes Alberca, Francesc Soler, Marina Huguet, Joan Senti's, Ana Sánchez, and Javier García-Sancho: Treatment of Knee Osteoarthritis With Autologous Mesenchymal Stem Cells: A Pilot Study.

21.- Moseley JB, O'Malley K, Petersen NJ, et al. A controlled trial of arthroscopic surgery for osteoarthritis of the knee. *N Engl J Med* 2002; 347: 81, mencionado por Lluís Orozco, Anna Munar, Robert Soler, Mercedes Alberca, Francesc Soler, Marina Huguet, Joan Senti's, Ana Sánchez, and Javier García-Sancho: Treatment of Knee Osteoarthritis With Autologous Mesenchymal Stem Cells: A Pilot Study.

22.- Manheimer E, Cheng K, Linde K, et al. Acupuncture for peripheral joint osteoarthritis. *Cochrane Database Syst Rev* 2010; CD001977, mencionado por Lluís Orozco, Anna Munar,

Robert Soler, Mercedes Alberca, Francesc Soler, Marina Huguet, Joan Senti's, Ana Sánchez, and Javier García-Sancho: Treatment of Knee Osteoarthritis With Autologous Mesenchymal Stem Cells: A Pilot Study.

23.- Pridie KH. A method of resurfacing knee joints. Proceedings of the British Orthopaedic Association. *J Bone Joint Surg Br.* 1959;41: 618, mencionado por Patrick Orth, Driscoll SW, Ana Rey-Rico, Jagadeesh K Venkatesan, Henning Madry y Magali Cucchiari ni en su revisión Current perspectives in stem cell research for knee cartilage repair.

24.- Steadman JR, Rodkey WG, Rodrigo JJ. Microfracture: surgical technique and rehabilitation to treat chondral defects. *Clin Orthop Relat Res.* 2001;391 Suppl:S362–S369, mencionado por Patrick Orth, Driscoll SW, Ana Rey-Rico, Jagadeesh K Venkatesan, Henning Madry y Magali Cucchiari ni en su revisión Current perspectives in stem cell research for knee cartilage repair.

25.- Johnson LL. Arthroscopic abrasion arthroplasty historical and pathologic perspective: present status. *Arthroscopy.* 1986;2(1):54–69, mencionado por Patrick Orth, Driscoll SW, Ana Rey-Rico, Jagadeesh K Venkatesan, Henning Madry y Magali Cucchiari ni en su revisión Current perspectives in stem cell research for knee cartilage repair.

26.- Friedenstein AJ, chailakhyan RK, Latsinik NV, pnasyuk AS, keiliss-Borok IV (1974) Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning in vitro and re-transplantation in vivo. *Transplantation* 17, 331–40, Fereydoun DAVATCHI, Bahar SADEGHI ABDOLLAHI, Mandana MOHYEDDIN, Farhad SHAHRAM and Behrooz NIKBIN: Mesenchymal stem cell therapy for knee osteoarthritis. Preliminary report of four patients.

27.- Pereira RF, Halford KW, O'Hara MD, Leeper DB, Sokolov BP, Pollard MD, Bagasra O, Prockop DJ.: Cultured adherent cells from marrow can serve as long-lasting precursor cells for bone, cartilage, and lung in irradiated mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92:4857- 4861, mencionado por Christopher J. Centeno, MD, Dan Busse MD, John Kisiday, PhD, Cristin Keohan, Michael Freeman, PhD, and David Karli, MD: Increased Knee Cartilage Volume in Degenerative Joint Disease using Percutaneously Implanted, Autologous Mesenchymal Stem Cells.

28.- Crisostomo PR, Wang M, Wairiuko GM, Morrell ED, Terrell AM, Seshadri P, Nam UH, Meldrum DR. High passage number of stem cells adversely affects stem cell activation and myocardial protection. *Shock* 2006; 26:575-580, mencionado por Christopher J. Centeno, MD, Dan Busse MD, John Kisiday, PhD, Cristin Keohan, Michael Freeman, PhD, and David Karli, MD:

Increased Knee Cartilage Volume in Degenerative Joint Disease using Percutaneously Implanted, Autologous Mesenchymal Stem Cells.

29.- Mackay AM, Beck SC, Murphy JM, Barry FP, Chichester CO, Pittenger MF.: Chondrogenic differentiation of cultured human mesenchymal stem cells from marrow. *Tissue Eng.* 1998; 4(4):415–428, mencionado por Patrick Orth, Driscoll SW, Ana Rey-Rico, Jagadeesh K Venkatesan, Henning Madry y Magali Cucchiari en su revisión Current perspectives in stem cell research for knee cartilage repair.

30.- Baksh D, Yao R, Tuan RS.: Comparison of proliferative and multilineage differentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from umbilical cord and bone marrow. *Stem Cells.* 2007;25(6):1384–1392, mencionado por Patrick Orth, Driscoll SW, Ana Rey-Rico, Jagadeesh K Venkatesan, Henning Madry y Magali Cucchiari en su revisión Current perspectives in stem cell research for knee cartilage repair.

31.- Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell.* 2002; 13(12):4279–4295, mencionado por Patrick Orth, Driscoll SW, Ana Rey-Rico, Jagadeesh K Venkatesan, Henning Madry y Magali Cucchiari en su revisión Current perspectives in stem cell research for knee cartilage repair.

32.- Koga H, Muneta T, Nagase T, et al. Comparison of mesenchymal tissues-derived stem cells for in vivo chondrogenesis: suitable conditions for cell therapy of cartilage defects in rabbit. *Cell Tissue Res.* 2008; 333(2):207–215, mencionado por Patrick Orth, Driscoll SW, Ana Rey-Rico, Jagadeesh K Venkatesan, Henning Madry y Magali Cucchiari en su revisión Current perspectives in stem cell research for knee cartilage repair.

33.- Fan J, Varshney RR, Ren L, Cai D, Wang DA. Synovium-derived mesenchymal stem cells: a new cell source for musculoskeletal regeneration. *Tissue Eng Part B Rev.* 2009;15(1):75–86, mencionado por Patrick Orth, Driscoll SW, Ana Rey-Rico, Jagadeesh K Venkatesan, Henning Madry y Magali Cucchiari en su revisión Current perspectives in stem cell research for knee cartilage repair.

34.- Mara CS, Sartori AR, Duarte AS, Andrade AL, Pedro MA, Coimbra IB. Periosteum as a source of mesenchymal stem cells: the effects of TGF-beta3 on chondrogenesis. *Clinics (Sao Paulo).* 2011;66(3):487–492, mencionado por Patrick Orth, Driscoll SW, Ana Rey-Rico, Jagadeesh K Venkatesan, Henning Madry y Magali Cucchiari en su revisión Current perspectives in stem cell research for knee cartilage repair.

35.- Kern S, Eichler H, Stoeve J, Kluter H, Bieback K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells*. 2006;24(5):1294–1301, mencionado por Patrick Orth, Driscoll SW, Ana Rey-Rico, Jagadeesh K Venkatesan, Henning Madry y Magali Cucchiari en su revisión Current perspectives in stem cell research for knee cartilage repair.

36.- de Yan H, Yu C.: Repair of full-thickness cartilage defects with cells of different origin in a rabbit model. *Arthroscopy*. 2007;23(2):178–187, mencionado por Patrick Orth, Driscoll SW, Ana Rey-Rico, Jagadeesh K Venkatesan, Henning Madry y Magali Cucchiari en su revisión Current perspectives in stem cell research for knee cartilage repair.

37.- Matsumoto T, Kubo S, Meszaros LB, et al.: The influence of sex on the chondrogenic potential of muscle-derived stem cells: implications for cartilage regeneration and repair. *Arthritis Rheum*. 2008;58(12):3809–3819, mencionado por Patrick Orth, Driscoll SW, Ana Rey-Rico, Jagadeesh K Venkatesan, Henning Madry y Magali Cucchiari en su revisión Current perspectives in stem cell research for knee cartilage repair.

38.- Blum B, Benvenisty N. Clonal analysis of human embryonic stem cell differentiation into teratomas. *Stem Cells*. 2007;25(8): 1924–1930, mencionado por Patrick Orth, Driscoll SW, Ana Rey-Rico, Jagadeesh K Venkatesan, Henning Madry y Magali Cucchiari en su revisión Current perspectives in stem cell research for knee cartilage repair.

39.- Hou P, Li Y, Zhang X, et al. Pluripotent stem cells induced from mouse somatic cells by small-molecule compounds. *Science*. 2013;341(6146): 651–654, mencionado por Patrick Orth, Driscoll SW, Ana Rey-Rico, Jagadeesh K Venkatesan, Henning Madry y Magali Cucchiari en su revisión Current perspectives in stem cell research for knee cartilage repair.

40.- En el artículo de Diekman BO, Christoforou N, Willard VP, et al. Cartilage tissue engineering using differentiated and purified induced pluripotent stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012; 109(47):19172–19177, mencionado por Patrick Orth, Driscoll SW, Ana Rey-Rico, Jagadeesh K Venkatesan, Henning Madry y Magali Cucchiari en su revisión Current perspectives in stem cell research for knee cartilage repair.

41.- Frenkel SR, Toolan B, Menche D, Pitman MI, Pachence JM. Chondrocyte transplantation using a collagen bilayer matrix for cartilage repair. *J Bone Joint Surg Br*. 1997; 79(5):831–836, mencionado por Patrick Orth, Driscoll SW, Ana Rey-Rico, Jagadeesh K Venkatesan, Henning Madry y Magali Cucchiari en su revisión Current perspectives in stem cell research for knee cartilage repair.

42.- Ho W, Tawil B, Dunn JC, Wu BM. The behavior of human mesenchymal stem cells in 3D fibrin clots: dependence on fibrinogen concentration and clot structure. *Tissue Eng.* 2006; 12(6):1587–1595, mencionado por Patrick Orth, Driscoll SW, Ana Rey-Rico, Jagadeesh K Venkatesan, Henning Madry y Magali Cucchiari en su revisión Current perspectives in stem cell research for knee cartilage repair.

43.- Tognana E, Borrión A, De Luca C, Pavesio A. Hyalograft C: hyaluronan-based scaffolds in tissue-engineered cartilage. *Cells Tissues Organs.* 2007; 186(2):97–103, mencionado por Patrick Orth, Driscoll SW, Ana Rey-Rico, Jagadeesh K Venkatesan, Henning Madry y Magali Cucchiari en su revisión Current perspectives in stem cell research for knee cartilage repair.

44.- Guo X, Wang C, Duan C, et al. Repair of osteochondral defects with autologous chondrocytes seeded onto bioceramic scaffold in sheep. *Tissue Eng.* 2004; 10(11–12):1830–1840, mencionado por Patrick Orth, Driscoll SW, Ana Rey-Rico, Jagadeesh K Venkatesan, Henning Madry y Magali Cucchiari en su revisión Current perspectives in stem cell research for knee cartilage repair.

45.- Daher RJ, Chahine NO, Greenberg AS, Sgaglione NA, Grande DA. New methods to diagnose and treat cartilage degeneration. *Nat Rev Rheumatol.* 2009; 5(11):599–607, mencionado por Patrick Orth, Driscoll SW, Ana Rey-Rico, Jagadeesh K Venkatesan, Henning Madry y Magali Cucchiari en su revisión Current perspectives in stem cell research for knee cartilage repair.

46.- Martineau I, Lacoste E, Gagnon G.: Effects of calcium and thrombin on growth factor release from platelet concentrates: Kinetics and regulation of endothelial cell proliferation. *Biomaterials* 2004; 25:4489-4502, mencionado por Christopher J. Centeno, MD, Dan Busse MD, John Kisiday, PhD, Cristin Keohan, Michael Freeman, PhD, and David Karli, MD: Increased Knee Cartilage Volume in Degenerative Joint Disease using Percutaneously Implanted, Autologous Mesenchymal Stem Cells.

47.- Doucet, C. Ernou I, Zhang Y, Llense JR, Begot L, Holy X, Lataillade JJ.: Platelet lysates promote mesenchymal stem cell expansion: A safety substitute for animal serum in cell-based therapy applications. *J Cell Physiol* 2005; 205:228-236, mencionado por Patrick Orth, Driscoll SW, Ana Rey-Rico, Jagadeesh K Venkatesan, Henning Madry y Magali Cucchiari en su revisión Current perspectives in stem cell research for knee cartilage repair.

48.- Saw KY, Anz A, Merican S, 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(4):493–506, mencionado por Patrick

Orth, Driscoll SW, Ana Rey-Rico, Jagadeesh K Venkatesan, Henning Madry y Magali Cucchiarini en su revisión Current perspectives in stem cell research for knee cartilage repair.

49.- Pak J.: Regeneration of human bones in hip osteonecrosis and human cartilage in knee osteoarthritis with autologous adipose-tissue-derived stem cells: a case series. *J Med Case Rep.* 2011; 5:296–303, mencionado por Patrick Orth, Driscoll SW, Ana Rey-Rico, Jagadeesh K Venkatesan, Henning Madry y Magali Cucchiarini en su revisión Current perspectives in stem cell research for knee cartilage repair.

50.- Slynarski K, Deszczynski J, Karpinski J.: Fresh bone marrow and periosteum transplantation for cartilage defects of the knee. *Transplant Proc.* 2006; 38(1):318–319 Brand C. Intra-articular and soft tissue injections. *Aust Fam Physician.* 1990; 19(5):671–675, 678, 680–672, mencionado por Patrick Orth, Driscoll SW, Ana Rey-Rico, Jagadeesh K Venkatesan, Henning Madry y Magali Cucchiarini en su revisión Current perspectives in stem cell research for knee cartilage repair.