

Tecniche tradizionali e approcci terapeutici sperimentali per la rigenerazione di lesioni cartilaginee



Ann. Ital. Chir., 2006; 77: 433-440

Walter Albisetti*, Laura de Girolamo**, Omar De Bartolomeo***, Anna Teresa Brini****

*Istituto di Scienze Ortopediche Traumatologiche Reumatologiche e Riabilitative, Università degli Studi di Milano; Istituto Ortopedico "G. Pini", Milano.

**Centro Studi e Ricerche sui Biomateriali, Università degli Studi di Milano; Dipartimento di Farmacologia Chemioterapia e Tossicologia Medica, Università degli Studi di Milano.

***I Scuola di Specializzazione in Ortopedia e Traumatologia, Istituto di Scienze Ortopediche Traumatologiche Reumatologiche e Riabilitative.

****Dipartimento di Farmacologia Chemioterapia e Tossicologia Medica, Università degli Studi di Milano.

Traditional techniques and experimental therapeutic approach for the restore of degenerate cartilages

Cartilage is unable to repair itself. The actual treatments for cartilage lesions primarily cover up symptoms only and this had led to develop alternative means to restore degenerated cartilage, above all by using cell therapy. The therapeutic approaches initially focused on the implantation of autologous chondrocytes, but this technique proved unsatisfactory. The discovery that several adult human tissues contain mesenchymal stem cells (MSCs) capable of differentiating into chondrocytes raised the possibility of using MSCs to repair cartilages.

In the present study we investigated whether mesenchymal stem cells from adipose tissue (hADAS) are able to differentiate into cartilage cells. We isolated cells from lipoaspirates, characterized them detecting specific surface markers by FACS analysis and immunofluorescence. We differentiate hADAS towards chondrogenic line in a culture media supplemented with some specific factors and in a specific condition called pellet culture.

The isolation of hADAS cells is reproducible and characterized by an high reproductivity, non dependent from the donor age. The expression of surface markers suits with the literature data.

The cells differentiated towards chondrogenic line in pellet culture show a different morphology from the undifferentiated cells.

The potential application of MSC therapy provides new hope for the development of innovative treatments for the repair of cartilage lesions and disorders.

KEY WORDS: Mesenchymal stem cells, Adipose tissue, Chondrogenic differentiation.

Introduzione

Hunter ¹ nel 1943 scriveva, "...dai tempi di Ippocrate ad oggi è universalmente accettato che le lesioni cartilaginee rappresentano un grosso problema e che una volta distrutta, essa non può venire rigenerata". Ancora oggi la rigenerazione della cartilagine articolare rappresenta un importante problema in campo ortopedico-reumatologi-

co e la ricerca di nuove e più efficaci procedure terapeutiche vede impegnati numerosi centri di ricerca nazionali e internazionali.

La cartilagine articolare dell'adulto è una cartilagine ialina, priva di vascolarizzazione e di drenaggio linfatico. Nel caso di lesioni superficiali, che non interessino l'osso subcondrale, non si ha sanguinamento, che normalmente dà origine al processo infiammatorio e alla migrazione di elementi cellulari indifferenziati presenti nel sangue, che, nell'ambiente articolare, potrebbero differenziarsi verso la linea condrogenica ². Nelle lesioni profonde, i meccanismi di riparazione della lesione sono facilitati dal sanguinamento dell'osso subcondrale e dalla migrazione di elementi del sangue e di fattori di crescita a livello condrale. A livello lesionale si osserva infatti la deposizione di collagene tipo II, caratteristico del-

Pervenuto in Redazione Marzo 2006. Accettato per la pubblicazione Giugno 2006.

Per la Corrispondenza: Prof. Walter Albisetti, Istituto Ortopedico "G. Pini", Istituto di Scienze Ortopediche Traumatologiche Reumatologiche e Riabilitative dell'Università di Milano, P.zza Cardinal Ferrari 1, 20122 Milano (e-mail: walter.albisetti@unimi.it).

la cartilagine ialina, ma anche di tipo I, principalmente caratteristico dei tessuti fibrosi.

La maggior parte delle lesioni della cartilagine articolare evolve dunque attraverso la formazione di un tessuto di riparazione fibro-cartilagineo avente proprietà biomeccaniche inferiori rispetto al tessuto originario³ e che, date le sue caratteristiche, non è in grado di integrarsi perfettamente con il tessuto cartilagineo perilesionale. Questo porta spesso ad un'evoluzione artrosica dell'articolazione coinvolta nell'evento traumatico.

Approcci terapeutici tradizionali

Le procedure chirurgiche attualmente utilizzate per il trattamento delle lesioni condrali sono certamente un valido strumento, ma presentano alcune limitazioni^{4,5}. Tra le metodiche scarsamente invasive ricordiamo la viscosupplementazione, introdotta in Italia a partire dal 1987, che prevede l'infiltrazione nello spazio intra-articolare di derivati dell'acido ialuronico (HA), ad alto e a basso peso molecolare⁶⁻⁸.

Il lavaggio artroscopico consiste in un lavaggio articolare mediante soluzione salina per rimuovere i frammenti ossei e cartilaginei liberi nel liquido sinoviale, ma il semplice lavaggio è in grado solo di ridurre la sintomatologia algica e non di risolvere completamente il problema⁶. L'efficacia di questo trattamento è soltanto temporanea e pertanto consigliato per i pazienti più anziani.

Il *debridement* consiste nella rimozione di porzioni di membrana sinoviale infiammata e ipertrofica e di osteofiti che sono causa o intensificano la sintomatologia. In media l'80% dei pazienti riferisce un miglioramento della sintomatologia per circa 12 mesi dal trattamento, dovuto alla degradazione degli enzimi che favoriscono il

processo sinoviale e il danno condrale. Il *debridement*, che non deve coinvolgere l'osso subcondrale, dovrebbe essere considerato il trattamento di prima scelta nei difetti cartilaginei parziali o a tutto spessore.

Nel 1959 Pridie introdusse per la prima volta il trattamento delle perforazioni multiple. La tecnica inizialmente prevedeva la perforazione della superficie cartilaginea fino all'osso subcondrale e trabecolare e questo approccio potrebbe essere una delle cause della degenerazione in senso fibrotico del tessuto di riparazione in seguito a tali perforazioni. La procedura si è pertanto evoluta e oggi si prediligono le microperforazioni multiple, eseguite a distanza di 3-4 mm una dall'altra e che si approfondano solo fino all'osso subcondrale. Evidenze cliniche suggeriscono di praticare una precoce mobilizzazione continua passiva, al fine di favorire la differenziazione del tessuto di riparazione⁹. Secondo gli stessi Autori, i controlli a 7 anni mostrano una percentuale di successo nel 75% dei casi.

L'artroplastica per abrasione secondo la tecnica di Johnson¹⁰, riduce la sintomatologia nel 77% dei casi a 2 anni dal trattamento. Essa prevede l'abrasione superficiale dell'osso subcondrale con una fresa motorizzata, rimuovendo 1-2 mm di osso. Questo permette di raggiungere la vascolarizzazione intracorticale, favorendo dunque il ripopolamento della lesione ad opera dei fibroblasti e delle cellule staminali. La "toppa" riparativa generata ha tuttavia caratteristiche biomeccaniche inferiori rispetto alla cartilagine nativa, in particolare in difetti di grande estensione.

Tutti i trattamenti chirurgici utilizzati fino ad oggi permettono un controllo solo temporaneo della sintomatologia e della eventuale progressione della malattia e inoltre portano alla formazione di fibrocartilagine, un tessuto molto simile a quello cicatriziale, fibroso (Tab. I). Sulla base di questa osservazione molti ricercatori han-

TABELLA I – Lesioni cartilaginee: confronto tra gli attuali trattamenti chirurgici.

Procedura	Vantaggi	Svantaggi
Lavaggio artroscopico	<ul style="list-style-type: none"> • Riduce il dolore • Visione diretta delle lesioni 	<ul style="list-style-type: none"> • Non tratta le lesioni, ma solo i sintomi • Effetto temporaneo
Debridement	<ul style="list-style-type: none"> • Riduce il dolore (80%) • Rimuove i sintomi meccanici 	<ul style="list-style-type: none"> • Non interviene sulle cause della lesione • Effetto temporaneo (12 mesi)
Perforazioni multiple	<ul style="list-style-type: none"> • Riduce il dolore (40%) • Tratta l'area lesionata 	<ul style="list-style-type: none"> • Effetto temporaneo • Possibile degenerazione del tessuto di riparazione • Provocano necrosi nell'area della lesione
Microfratture multiple	<ul style="list-style-type: none"> • Riduce il dolore (75%) • Tratta l'area lesionata • Non provoca necrosi 	<ul style="list-style-type: none"> • Effetto temporaneo
Artroplastica per abrasione	<ul style="list-style-type: none"> • Riduce il dolore (77%) • Tratta l'area lesionata 	<ul style="list-style-type: none"> • Effetto temporaneo

no intrapreso la strada della terapia cellulare, introducendo tecniche volte alla sostituzione (trapianto) delle zone lesionate mediante impiego di elementi cellulari autologhi^{11;12}.

Tra le tecniche più recentemente introdotte volte a ripristinare l'integrità strutturale e funzionale della cartilagine mediante terapia cellulare, vi è il Trapianto Autologo di Condrociti: i condrociti, ottenuti da un piccolo frustolo di cartilagine prelevato dal paziente stesso da una zona non di carico, vengono espansi *in vitro*, "seminati" su appositi substrati biologici o *scaffold*, necessari per il successivo innesto nella zona di lesione e per fornire ai condrociti un ambiente 3D in cui mantenere il proprio fenotipo differenziato. In questo modo le cellule, attecchendo alla zona lesionata, dovrebbero essere in grado di proliferare e ripristinare la struttura cartilaginea. La tecnica del Trapianto Autologo di Condrociti presenta però alcuni limiti, tra cui la resa cellulare fortemente dipendente dall'età del paziente e l'incapacità dei condrociti di mantenere il proprio fenotipo ben differenziato. Infatti durante la fase di espansione, necessaria per raggiungere un numero di cellule sufficiente per il successivo impianto, i condrociti divengono fenotipicamente instabili, si appiattiscono e si trasformano in cellule fibroblastoidi. La semina delle cellule sugli scaffold tridimensionali non garantisce la totale riacquisizione del fenotipo condrocitario della popolazione cellulare, con conseguente ottenimento di un tessuto di riparazione fibrocartilagineo, dalle capacità biochimiche e biomeccaniche diverse da quelle della cartilagine articolare nativa.

Terapia con cellule staminali

Tali limitazioni potrebbero essere superate utilizzando cellule staminali mesenchimali (MSCs, Mesenchymal Stem Cells), isolabili in numerosi tessuti. Le cellule staminali adulte possono essere facilmente isolate, espanse in coltura *in vitro* per numerose generazioni, mantenendo inalterata a loro capacità di differenziare. Nell'ultimo decennio sono stati condotti numerosi studi inerenti la caratterizzazione delle cellule staminali mesenchimali adulte in seguito ai quali è emerso un loro utilizzo potenziale nella medicina rigenerativa e nella ingegneria tissutale¹³. Le MSCs sotto opportuni segnali sono in grado di differenziare principalmente in cellule della linea connettivale, tra cui quelle della linea osteogenica e condrogenica (Tab. II).

Negli ultimi anni si sono intensificati gli sforzi per riuscire ad impiegare le MSCs nella rigenerazione di tessuti, in particolare di quelli dell'apparato locomotore; i primi risultati emersi, seppur non ancora a livello di applicazione clinica, sono decisamente incoraggianti^{14;15}. Attualmente il sito elettivo per il prelievo delle MSCs è il midollo osseo e, sebbene tali cellule rappresentino una esigua frazione della popolazione totale di cellule nuclea-

re (0,001-0,01%), possono essere espanse con discreta efficienza e indotte a differenziare verso diverse linee cellulari in condizioni di coltura definite¹⁶.

Il nostro studio si propone di isolare MSC da un sito di prelievo alternativo al midollo osseo, poiché l'isolamento da midollo osseo è una procedura invasiva e mostra alcune limitazioni tra cui la sintomatologia dolorosa avvertita dal paziente e la scarsa quantità di midollo prelevabile con conseguente ottenimento di un basso numero di cellule staminali, in relazione anche all'età del donatore.

In particolare la nostra attenzione è stata rivolta al tessuto adiposo, un tessuto semplice da prelevare, con metodica indolore per il paziente e ottenibile in grande quantità. Inoltre la resa di cellule multipotenti da tessuto adiposo hADAS, sembra inoltre essere nettamente maggiore rispetto a quella ottenuta da midollo osseo^{17;18}. Le cellule hADAS possono essere indotte al differenziamento in particolare verso la linea condrogenica, osteogenica, adipogenica e miogenica. Attualmente il nostro studio è incentrato sul differenziamento verso la linea cartilaginea e ossea.

Materiali e metodi

PRELIEVO E PURIFICAZIONE DELLE MSCs

Su 12 pazienti di età compresa tra i 19 e i 60 anni è stato eseguito, mediante lipoaspirazione del pannicolo addominale sottocutaneo, un prelievo di tessuto adiposo compreso tra i 20 e i 50 g.

La componente cellulare è stata separata dal tessuto stromale mediante digestione enzimatica con collagenasi I, preceduta da alcuni cicli di lavaggio/centrifugazione, e posta in coltura. Nei giorni immediatamente successivi al prelievo, le cellule staminali mesenchimali sono state separate dalle altre popolazioni cellulari ottenute dalla digestione sfruttando la loro caratteristica di crescita in adesione.

Le cellule sono state mantenute in coltura con terreno completo (DMEM, 10% FBS, 1% L-Glutammina, 1% Penicillina-Streptomina).

Il tasso di crescita delle hADAS è stato valutato mediante conta cellulare eseguita ad ogni passaggio in coltura.

TABELLA II – Rintracciabilità e potenzialità delle cellule staminali mesenchimali.

Cellule staminali	Derivazione	Tessuti derivabili
Mesenchimali	Midollo Osseo,	Osso, Cartilagine, Tendine,
	Periostio, Osso trabecolare,	
	Tessuto adiposo,	Tessuto adiposo,
	Tessuto sinoviale, Muscolo scheletrico	Tessuto muscolare, Stroma midollare, Tessuto nervoso

CARATTERIZZAZIONE DELLE MSCs

Le cellule hADAS sono state caratterizzate mediante analisi citofluorimetrica con citofluorimetro a flusso (BD FACScalibur System). Sono stati utilizzati anticorpi specifici per marcatori di superficie caratterizzanti le MSCs, quali CD13, CD14, CD34, CD44, CD45, CD49d, CD71 e CD105¹⁷⁻¹⁹. Per la rilevazione di alcuni anticorpi, non direttamente fluorescinati, è stata utilizzata la Streptavidina-PE.

Inoltre sono stati condotti esperimenti di immunofluorescenza per determinare la colocalizzazione di marcatori specifici sulle singole cellule, utilizzando il fluorocromo DAPI (4,6 diamino-2-fenilindolo) come marcatore nucleare.

DIFFERENZIAMENTO E ANALISI

Le hADAS sono state indotte al differenziamento condrogenico e osteogenico coltivando le cellule in terreno di crescita completo supplementato con desametasone, ITS (Insulina-Transferrina-Selenio), sodio-piruvato, β -glicerofosfato e TGF- β nel caso della linea condrogenica e con desametasone e β -glicerofosfato ascorbato-2-fosfato nel caso della linea osteogenica¹⁹⁻²⁰.

L'induzione verso la linea condrogenica delle hADAS è stata condotta coltivando le cellule sia in monostrato, sia secondo la tecnica della pellet culture (micromassa).

Dopo 7, 14 e 21 giorni dall'inizio del differenziamento le cellule sono state dapprima fissate e quindi analizzate mediante colorazioni istologiche e istochimiche specifiche (Ematossilina-Eosina, Fosfatasi Alcalina, Alcian Blue).

Risultati

L'isolamento della componente cellulare mesenchimale dal tessuto adiposo si è rivelata una metodica riproducibile e caratterizzata da una buona resa, con una media di $1,2 \times 10^6$ cellule hADAS per ml di lipoaspirato grezzo (Fig. 1).

Confrontando campioni provenienti da pazienti di diverse età non sono state rilevate differenze significative riguardanti la resa cellulare.

Le curve di crescita elaborate con i dati provenienti dalle regolari conte cellulari mostrano un andamento esponenziale della proliferazione fino ad oltre il 40° giorno in coltura (Fig. 2). Le cellule hADAS indifferenziate, sottoposte a cicli di congelamento/scongelo, hanno mantenuto inalterati la loro vitalità e il loro potenziale proliferativo; tale caratteristica ci permette di crio-preserved le hADAS anche per lunghi periodi.

Le popolazioni cellulari esaminate al citofluorimetro (FACS) sono risultate omogenee a partire dal IV passaggio in coltura.

La caratterizzazione delle cellule hADAS isolate ha permesso la valutazione dell'espressione di alcuni marcatori

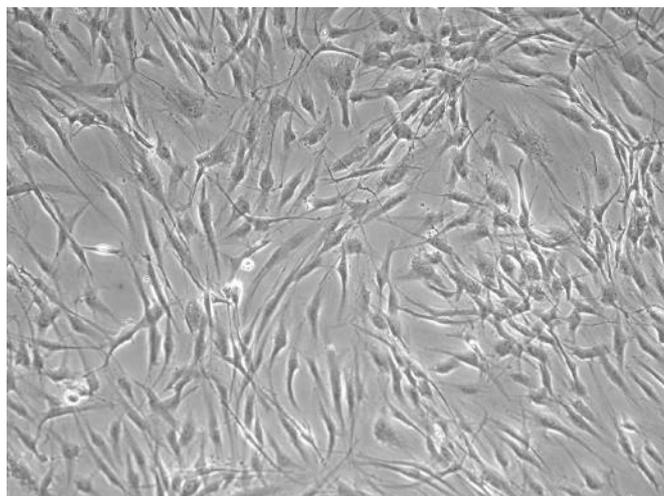


Fig. 1: Cellule hADAS in coltura monostrato al IV passaggio (10 X).

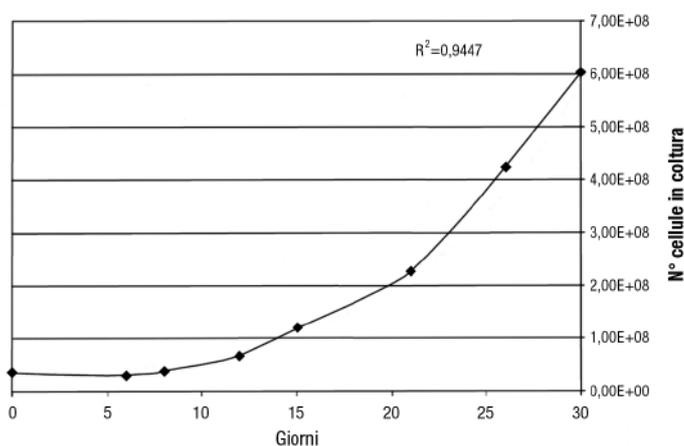


Fig. 2: Curva di crescita ad andamento esponenziale di cellule hADAS.

cellulari di superficie caratteristici delle cellule mesenchimali. In linea con i dati presenti in letteratura specifica¹⁸⁻²¹, nelle cellule hADAS è stata osservata un'elevata espressione di CD 13, CD 29, CD 44, CD 49d, CD 54, CD 90e CD 105 mentre risulta assente l'espressione di CD 14, CD 34, CD 45, CD 71 e CD 106. (Fig. 3; Tab. III). La co-espressione di alcuni marcatori è stata valutata sia mediante FACS sia con esperimenti di immunofluorescenza.

A partire dal IV passaggio le cellule hADAS sono state indotte al differenziamento, mantenendole in coltura per diversi tempi nei medium specifici. Al termine della sperimentazione si è quindi proceduto alla fissazione e alla colorazione specifica dei preparati. Dopo 15 giorni di differenziamento verso la linea condrogenica, le cellule hADAS subiscono una modificazione morfologica significativa, evidenziata in particolare dalla formazione di un tappeto cellulare di particolare aspetto (Fig. 4). Le cellule differenziate verso la linea cartilaginea con la tecnica della *pellet culture* acquistano una morfologia simile a

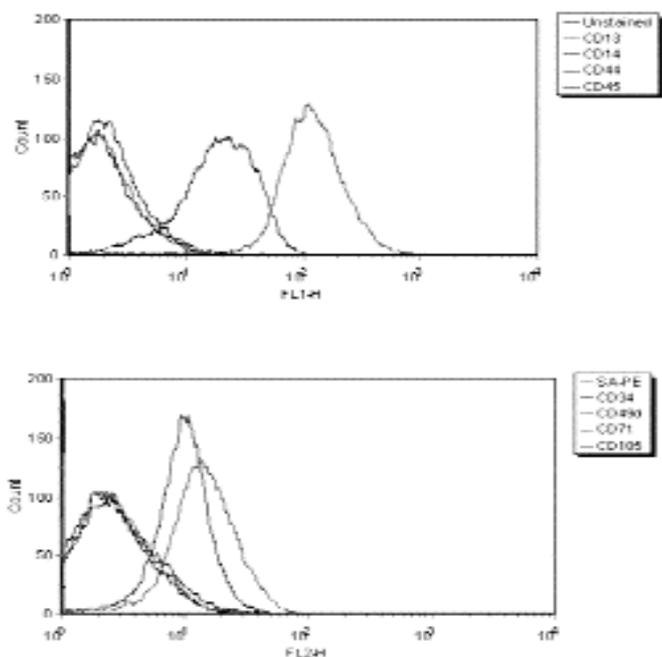


Fig. 3: Analisi dell'espressione di marcatori di superficie con citofluorimetria a flusso, mediante anticorpi fluorescenti (sopra) e anticorpi non direttamente marcati (sotto).

TABELLA III – Espressione di marcatori specifici per le cellule staminali mesenchimali.

Marcatori di superficie	hADAS: dato sperimentale	hADAS in letteratura
CD 13	+++	+++
CD 14	--	--
CD 34	+/-	+/-
CD 44	++	++
CD 45	--	--
CD 49d	++	++
CD 71	-	-
CD 105	++	++

quella dei condrociti/condroblasti: le cellule appaiono più ovali, meno fusate, il nucleo mostra profilo irregolare talvolta indentato e il citoplasma diventa più evidente (Fig. 5).

Discussione e conclusioni

La cartilagine articolare dell'adulto è una cartilagine ialina, priva di vascolarizzazione e di drenaggio linfatico. Quasi tutte le lesioni cartilaginee danno origine alla formazione di un tessuto di riparazione, caratterizzato da proprietà biomeccaniche inferiori rispetto al tessuto originario.

Nel corso degli anni sono state sviluppate diverse tecniche chirurgiche per il trattamento di difetti cartilaginei, nessuna delle quali però completamente efficace. I fallimenti derivano essenzialmente dalle caratteristiche biologiche del tessuto stesso, dal momento che l'assenza di vascolarizzazione impedisce la migrazione degli elementi cellulari indifferenziati presenti nel torrente circolatorio. Il sanguinamento provocato dalle microperforazioni chirurgiche non è in grado di provvedere ad una totale *restitutio ad integrum* della superficie cartilaginea mancando nell'ambiente articolare gli opportuni segnali molecolari che inducono al differenziamento.

Il nostro studio sperimentale mette in luce la possibilità di isolare e purificare cellule indifferenziate mesenchimali da tessuto adiposo con una metodica indolore, non invasiva e di più facile attuazione rispetto al prelievo da midollo osseo.

Le cellule hADAS crescono in coltura allo stato indifferenziato per lunghi periodi e possono subire cicli di congelamento e scongelamento senza che ne venga alterata la capacità proliferativa e differenziativa. Un altro vantaggio riscontrato riguarda la resa cellulare elevata che non è influenzata dall'età del soggetto donatore, come invece è stato descritto per cellule staminali provenienti da midollo osseo ²¹.

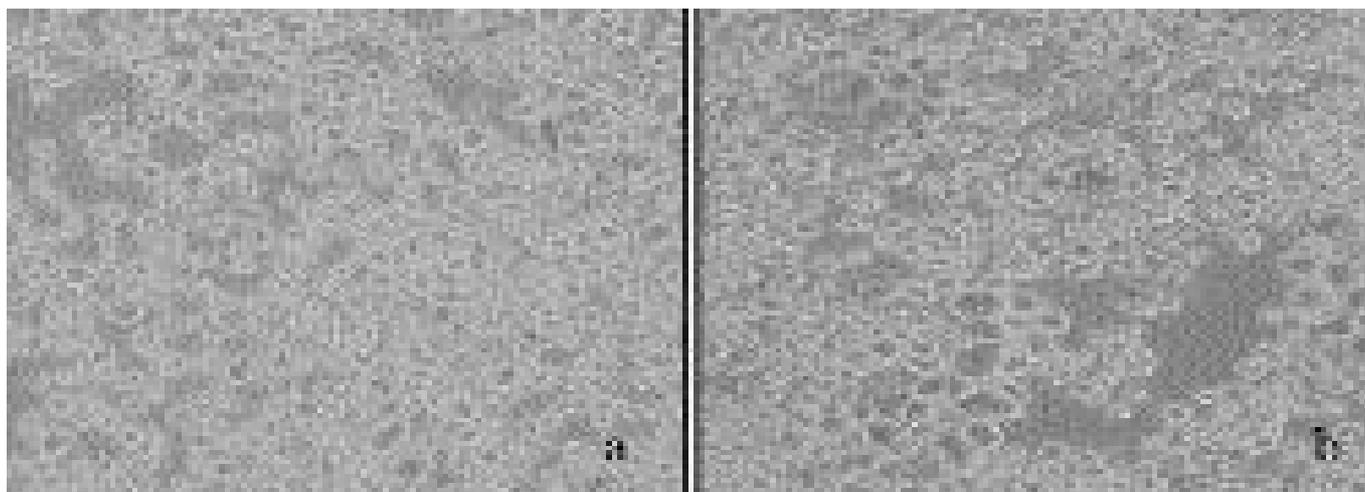


Fig. 4: Cellule in adesione in condizioni non differenzianti (a) e cellule in differenziamento verso la linea condrogenica (b) (10 X).

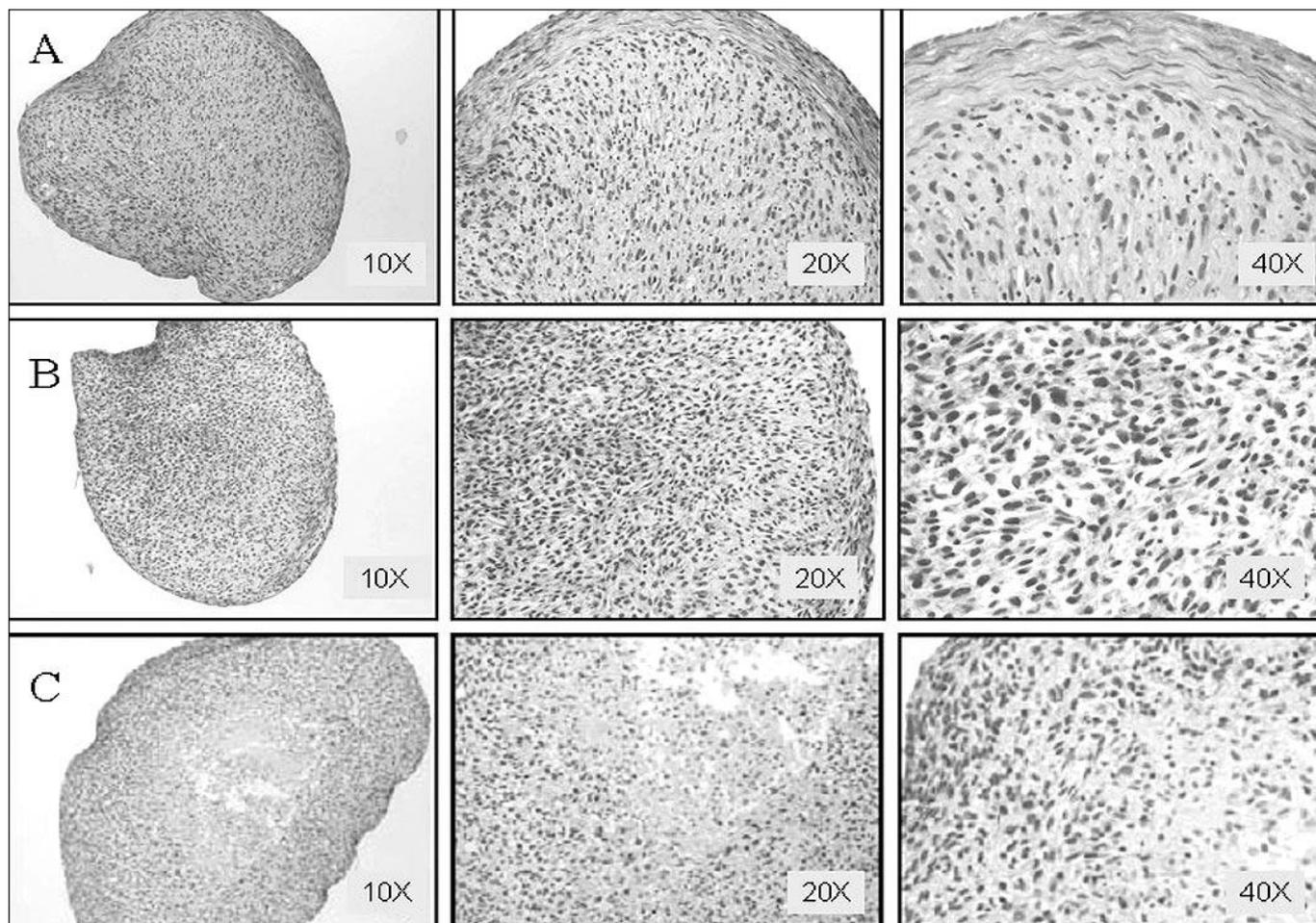


Fig. 5: Sezioni istologiche di micromassa (pellet culture) coltivata in presenza di medium non differenziante (a), di medium condrogenico (b) e di medium condrogenico addizionato con TGF- β (c). Colorazione ematossilina-eosina.

Attualmente sono in corso ulteriori studi per valutare differenti condizioni di crescita, che permettano di ridurre la presenza di fattori stimolanti esterni quali il siero fetale bovino attualmente utilizzato, e per implementare la gamma di marcatori caratterizzanti. Inoltre stiamo sperimentando nuove metodiche per differenziare più efficacemente le hADAS verso le linee cellulari dei tessuti scheletrici e nuove tecniche di indagine per valutare il grado di differenziazione raggiunto.

Il nostro protocollo di ricerca prevede quindi la differenziazione delle hADAS in presenza di diversi biomateriali, le cui caratteristiche di tridimensionalità e di supporto permetteranno di veicolare adeguatamente le cellule staminali differenziate nel sito di lesione, garantendo una loro applicabilità in campo clinico^{20;22}.

Riassunto

OBIETTIVO: Gli Autori definiscono le lesioni cartilaginee dell'adulto e inquadrano le metodiche terapeutiche tradizionali. Introducono il loro protocollo sperimentale basa-

to sull'impiego di cellule staminali mesenchimali da tessuto adiposo per la rigenerazione del tessuto cartilagineo. **INTRODUZIONE:** Il tessuto cartilagineo è un tessuto con scarsa attività riparativa che, in seguito ad un trauma, esita nella formazione di un tessuto dalle scarse proprietà biomeccaniche. Gli indiscutibili limiti degli attuali trattamenti della riparazione delle lesioni cartilaginee hanno contribuito a sviluppare nuovi approcci terapeutici, in particolare mediante l'utilizzo di terapie cellulari.

MATERIALI E METODI: Cellule hADAS sono state isolate da tessuto adiposo mediante digestione enzimatica e crescita in adesione. La caratterizzazione delle hADAS è stata eseguita mediante citofluorimetria a flusso e immunofluorescenza. La differenziazione delle cellule mesenchimali verso la linea condrogenica è avvenuta in presenza di fattori stimolanti addizionati al terreno di coltura e secondo la tecnica della *pellet culture*.

RISULTATI: La metodica di isolamento e purificazione delle hADAS è risultata riproducibile e caratterizzata da una buona resa indipendente dall'età del paziente.

L'espressione dei markers di membrana è in accordo con i dati presenti in letteratura.

Il differenziamento verso la linea condrogenica si è rivelato efficace: la morfologia delle cellule appare diversa da quelle delle hADAS indifferenziate, soprattutto nei campioni differenziati in *pellet culture*.

CONCLUSIONI: Il nostro studio sperimentale mette in luce la possibilità di isolare cellule staminali mesenchimali da tessuto adiposo per un futuro impiego nella riparazione di lesioni cartilaginee, con una metodica indolore, non invasiva e di più facile attuazione rispetto al prelievo da midollo osseo.

Bibliografia

- 1) Hunter W: *On the structure and disease of articular cartilages*. Philos Trans R Soc London Biol, 1943, 42:514.
- 2) Peretti GM: *Lesioni condrali e rigenerazione cartilaginea*. Arch di Ortop 2003; 114(1):8-10.
- 3) Mankin HJ: *The response of articular cartilage to mechanical injury*. J Bone Joint Surg Am, 1982; 64(3):460-66.
- 4) O'Driscoll SW: *The healing and regeneration of cartilage*. J Bone Joint Surg Am, 1998; 80(12):1795-812.
- 5) Giannini S, Vannini F: *Operative treatment of osteochondral lesions of the talar dome: Current concepts review*. Foot Ankle Int, 2004; 25(3):168-75.
- 6) Hubbard MJ: *Articular debridement versus washout for degeneration of the medial femoral condyle. A five-year study*. J Bone Joint Surg Br, 1996; 78(2):217-19.
- 7) Gilbert JE: *Current treatment options for the restoration of articular cartilage*. Am J Knee Surg, 1998; 11(1):42-46.
- 8) Steadman JR, Rodkey WG, Briggs KK: *Microfracture to treat full-thickness chondral defects: Surgical technique, rehabilitation, and outcomes*. J Knee Surg, 2002; 15(3):170-76.
- 9) Rodrigo JJ, Steadman RJ: *Improvement of full-thickness chondral defect healing in the human knee after debridement and microfracture using continuous passive motion*. Am J Knee Surg, 1994; 7:109-13.
- 10) Bert JM: *Abrasion arthroplasty*. Operative Techniques Orthop, 1997; 7(4):294-99.
- 11) Ronga M, Grassi FA, Bulgheroni P: *Arthroscopic autologous chondrocyte implantation for the treatment of a chondral defect in the tibial plateau of the knee*. Arthroscopy, 2004; 20(1):79-84.
- 12) Salvi AE, Metalli G, Ascari R, De Vitis R, Chessa A, Corona M: *Second look arthroscopico post-mosaicoplastica*. Arthroscopia, 2005; 6(1):33-40.
- 13) Magne D, Vinatier C, Julien M, Weiss P and Guicheux J: *Mesenchymal stem cell therapy to rebuild cartilage*. Trends in Molecular Medicine, 2005; 11(11):519-26.
- 14) Cancedda R, Bianchi G, Derubeis A, Quarto R: *Cell therapy for bone disease: a review of current status*. Stem Cells, 2003; 21(5):610-19.
- 15) Quarto R, Mastrogiacomo M, Cancedda R, Kutepov S, Mukachev V, Lavroukov A, Kon E, Marcacci M: *Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells*. N Engl J Med, 2001; 344(5):385-86.
- 16) Barry FP, Murphy JM: *Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization*. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2004; 36(4):568-84.
- 17) Gronthos S, Franklin DM, Leddy HA, Robey PG, Storms RW, Gimble JM: *Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells*. J Cell Physiol, 2001; 189(1):54-63.
- 18) Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH: *Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies*. Tissue engineering, 2001; 7(2):211-28.
- 19) Erickson GR, Gimble JM, Franklin DM, Rice HE, Awad H, Guilak F: *Chondrogenic potential of adipose tissue-derived stromal cells in vitro and in vivo*. Biochem Biophys Res Commun, 2002; 290(2): 763-69.
- 20) Awad HA, Wickham MQ, Leddy HA, Gimble JM, Guilak F: *Chondrogenic differentiation of adipose-derived adult stem cells in agarose, alginate, and gelatin scaffolds*. Biomaterials, 2004; 25(16):3211-222.
- 21) Lee JW, Kim YH, Kim SH, Han SH, Hahn SB: *Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells and its clinical applications*. Yonsei Med J, 2004; 45(Suppl):41-47.
- 22) Li WJ, Tuli R, Huang X, Laquerriere P, Tuan RS: *Multilineage differentiation of human mesenchymal stem cells in a three-dimensional nanofibrous scaffold*. Biomaterials, 2005; 26(25):5158-166.

