

Concentración de células mononucleares como predictor de la población de células madre mesenquimales en aspirado de médula ósea. Estudio comparativo entre cresta ilíaca, metáfisis distal de fémur y metáfisis proximal de tibia

Mononuclear cell concentration as predictive tool of mesenchymal stem cells on bone marrow aspiration. A comparative study between iliac crest, distal femur metaphysis and proximal tibial metaphysis

Narbona FJ¹, Vaquero Martín J¹, Fernández Santos ME²

¹ Servicio de Cirugía Ortopédica y Traumatología HGU. ²Laboratorio de Terapia Celular Gregorio Marañón, Madrid.

Esta investigación ha sido financiada por FUNDACIÓN MAPFRE

Resumen

Objetivo: Investigar la concentración de células mononucleadas (CMNs) en aspirados de médula ósea de las metáfisis distal de fémur y proximal de tibia comparando con la procedente de cresta ilíaca, para valorar su potencial como fuente alternativa para la obtención de células mesenquimales pluripotenciales (MSC).

Material y métodos: En 20 pacientes previamente a su cirugía de sustitución total de rodilla se obtuvieron muestras de aspirado de médula ósea de cresta ilíaca, fémur distal y tibia proximal. Las muestras se procesaron en laboratorio para aislamiento de MSCs, cultivo y expansión.

Resultados: Se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,01$) en cuanto a la concentración y viabilidad de las CMNs, siendo superior en cresta ilíaca. La tasa de éxito de los cultivos fue claramente inferior en tibia (47%) respecto a fémur (71%) y cresta ilíaca (90%). A igual número de células plantadas no se encontraron diferencias en el número final ni en la viabilidad de las MSCs obtenidas.

Conclusiones: La punción-aspiración de médula ósea en fémur distal y tibia proximal permite la obtención de CMNs y MSCs en menor concentración que la punción de cresta ilíaca.

Palabras clave:

Mononuclear, estromal, mesenquimal, células madre, tibia, fémur, cresta ilíaca, médula ósea.

Abstract

Objective: Investigate concentration of mononuclear cells in bone marrow aspirates from metaphyseal bone from distal femur and proximal tibia compared to bone marrow from iliac crest to evaluate their potential role as alternative sources to obtain MSCs.

Material and methods: In 20 patients who were going to receive total knee arthroplasty surgery at our institution were included. Samples were obtained prior to surgery from three different locations: Iliac crest, distal femoral metaphysis and proximal tibial metaphysis. Samples were processed to isolate MSCs, and then were cultured for in vitro expansion.

Results: Significant differences ($p < 0,01$) were observed in concentration and viability of mononucleated cells (CMNs), being superior in samples from iliac crest. At a same number of cells planted for culture no differences were found in final MSCs total number nor their viability. Success rate of cultures were clearly inferior in samples obtained from tibia (47%) than femur (71%) and iliac crest (90%).

Conclusion: Aspiration of distal femur and proximal tibia bone marrow provides a lower concentration of CMNs and MSCs than bone marrow aspiration from iliac crest.

Key words:

Mononuclear, mesenchymal, stromal, stem cell, tibia, femur, iliac crest, bone marrow.

Correspondencia

J. Vaquero
Servicio de COT. Hospital General Universitario Gregorio Marañón
Doctor Esquerdo 46. 28008 Madrid, España
vaqueroct@aeartroscopia.es

I Introducción

La obtención de muestras de células mesenquimales con fines terapéuticos supone un proceso invasivo en mayor o menor medida, aunque en algunos casos pueden obtenerse a partir de productos de desecho como son la placenta, el cordón umbilical o la grasa procedente de liposucción. Tradicionalmente, la fuente más utilizada para la obtención de células madre adultas es el aspirado de médula ósea, donde se encuentran predominantemente dos tipos de células troncales, las células madre hematopoyéticas (HSC) y las células madre mesenquimales (MSC). Estas son las más usadas en terapia por su facilidad de identificación y expansión en cultivo, multipotencialidad y efectos sobre el microambiente que las rodea (inmunomodulación, efectos paracrinos) [1]. Estas características les proporcionan propiedades reparadoras y regenerativas de los tejidos dañados donde se encuentran. Friedenstein y Owen [2] fueron los primeros en describir este tipo de células derivadas de la médula ósea y desde entonces ha existido una gran confusión entre los investigadores en cuanto a la nomenclatura y propiedades de estas células. Inicialmente fueron descritas como unidades de fibroblastos formadores de colonias (CFU-F), con capacidad de adherencia al plástico y actividad osteogénica *in vitro*. Posteriormente se observó que estas células tenían capacidad clónica y de diferenciación con otros tejidos del mesoderma (músculo, tendón, cartílago, grasa) y con capacidad *in vitro* para diferenciarse de células del endoderma y ectoderma, por lo que surgió el concepto de células madre mesenquimales (MSC) [3]. El grupo de células adherentes al plástico procedentes de médula ósea es heterogéneo y no todas presentan las características requeridas para ser consideradas células multipotentes [4].

La Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT) ha descrito los criterios mínimos que debe cumplir una célula para ser considerada MSC [5]: adherencia al plástico, expresión o carencia de determinados antígenos de superficie, capacidad de expansión *in vitro* y diferenciación hacia grasa, cartílago y hueso. Por tanto, las células de médula ósea adherentes al plástico, capaces de generar colonias, deben ser denominadas «células estromales mesenquimales» (CEM), reservando el término «célula madre mesenquimal» únicamente para aquellas con capacidad de diferenciación a grasa, hueso y cartílago [4]. La proporción de MSCs supone un porcentaje variable, entre 0,04 y 0,005% [6-8], de las células mononucleadas presentes en la médula ósea.

La punción-aspiración de la cresta ilíaca permite obtener una gran cantidad de muestra de buena calidad [9][10]. No obstante, la técnica para punción requiere personal entrenado y no está exenta de posibles complicaciones. Otra lo-

calización más accesible y con menor riesgo potencial es la esponjosa de las metafisis alrededor de la rodilla, aunque tras haber realizado una extensa búsqueda bibliográfica no hemos encontrado otros estudios que indiquen claramente la presencia y características de las MSCs a dicho nivel. Basándonos en estas observaciones, hemos realizado un estudio prospectivo, no aleatorizado, comparando la presencia de células mononucleadas en las muestras de aspirado de médula ósea de un grupo de pacientes sometidos a una intervención de prótesis total de rodilla. En el contexto de la cirugía se realizó a cada paciente punción-aspiración de médula ósea de tres localizaciones distintas: cresta ilíaca, metafisis distal de fémur y metafisis proximal de tibia, analizando las muestras y comparando sus características entre sí. Nuestra hipótesis es que la médula ósea de las metafisis distal de fémur y proximal de tibia presenta una concentración similar de células mononucleadas.

I Material y métodos

Tras la aprobación del comité de ética de nuestro centro, se incluyó en el estudio a pacientes diagnosticados de gonartrosis programados para artroplastia total de rodilla con una edad menor de 75 años y que dieron su consentimiento informado para la participación en el estudio. Se excluyeron del mismo aquellos pacientes mayores de 75 años, en tratamiento con citostáticos o corticoides, con historia de alcoholismo, presencia de lesiones dérmicas en extremidades inferiores, radioterapia previa afectando a pelvis o rodilla, infección activa, anemia ($Hb < 10,0 \text{ gr/dL}$), leucopenia ($leucocitos < 4.000/mm^3$) o procesos tumorales activos.

En total, participaron 23 pacientes. De ellos, tres fueron eliminados del estudio por presentar criterios de exclusión. En otros tres pacientes se extrajeron las muestras con la isquemia aplicada sobre el miembro, por lo que estas muestras procedentes de fémur y tibia no fueron incluidas en el estudio. En un caso no se obtuvo médula ósea de tibia al realizar el aspirado, por causa desconocida. Tras las pérdidas, quedan en el estudio 20 pacientes (20 aspirados de cresta ilíaca, 17 de fémur y 16 de tibia), en 4 varones y 16 mujeres, con edades comprendidas entre 64 y 75 años (media 71 años).

Técnica de aspirado medular

Las muestras se tomaron en quirófano siempre por el mismo investigador, con el paciente en decúbito supino bajo anestesia epidural y siguiendo técnica estéril. El proceso se realizó en los instantes previos al comienzo de la cirugía y antes de aplicar isquemia sobre el miembro. Para realizar el aspirado de médula ósea, empleamos un trócar de 11' canulado con orificios laterales y conexión tipo Lúer-Lock

(Synthes®) (Figura 1). En primer lugar, efectuamos la punción-aspiración sobre cresta ilíaca anterior, del mismo lado a intervenir, realizando la entrada en un punto situado aproximadamente a 5 cm posteriores a la espina ilíaca anterosuperior y dirigiendo la punta del trócar hacia el espesor del ilíaco. A continuación, se puncionó la metafisis distal del fémur, en la cara anterior de la rodilla, en el punto inmediatamente proximal al polo superior de la rótula, inclinando la aguja unos 30° en dirección caudal (Figura 2). Por último, se repitió la punción en la tibia; la entrada se realizó a nivel de la tuberosidad tibial anterior en dirección paralela al plano articular. Los puntos de inserción en fémur y tibia se realizan en línea con la incisión de piel programada para la artroplastia. En cada localización se aspiró la médula ósea, variando la orientación y profundidad del trócar por cada 2 mL aspirados para prevenir dilución de la muestra con sangre periférica [11].



Fig. 1. Trócar para punción-aspiración de médula ósea con orificios laterales (BMA system, Synthes®).

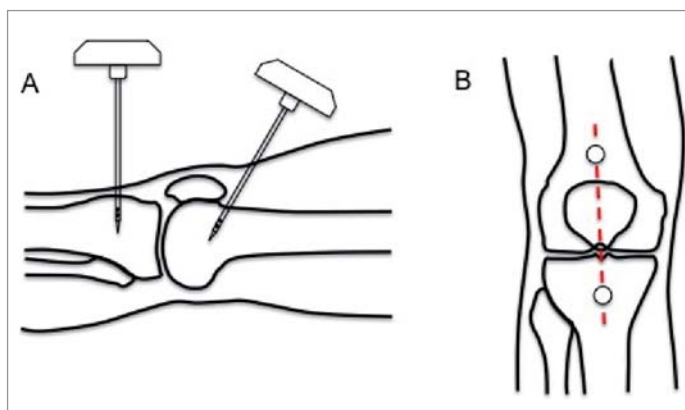


Fig. 2. Localización de los puntos de punción para el aspirado. A: En el plano lateral sobre fémur, proximal al polo superior de rótula con una inclinación caudal de 30°; sobre tibia, perpendicular a tuberosidad tibial. B: En el plano anteroposterior se punciona en línea sobre la incisión programada para la artroplastia.

El proceso para la extracción de las muestras de fémur y tibia fue sencillo, localizando las referencias anatómicas para la punción fácilmente en todos los casos, incluso en pacientes obesos. No hubo complicaciones en ningún caso y la cirugía programada se llevó a cabo sin alteraciones en todos los pacientes. El dolor residual tras la punción de fémur y tibia no se pudo valorar dado el contexto quirúrgico del paciente.

Las muestras del aspirado son recogidas en tubos heparinizados (heparina 1%, 1 ml. por cada 10 ml. de médula ósea) y etiquetadas. A continuación, se transportaron inmediatamente al laboratorio para su procesamiento y análisis.

Procesado de las muestras en laboratorio

Se realizó un filtrado para eliminar los coágulos y los restos sólidos, pasando las muestras por un filtro estándar de 200 μm . A continuación se efectuó un hemograma y citometría, preliminares de las muestras, para recuento celular y para confirmar que la muestra procedía de la médula ósea y no se encontraba contaminada por sangre periférica.

Se realizó una selección de las células mononucleadas mediante separación por gradiente de densidad (Ficoll-Paque®). La muestra resultante se sometió a lavados y choque osmótico para eliminar restos celulares no deseados [12]. Después se recontaron las células mononucleadas viables en cámara de Neubauer mediante tinción con azul tripán. La muestra de CMNs se plantó en frascos de cultivo con suelo de plástico en un medio apto para la expansión de MSCs compuesto por DMEM (Medio de Eagle modificado por Dulbecco), suplementado con glutamato, FBS (suero bovino fetal) al 10%, penicilina al 1% y estreptomycin al 1%.

Las muestras se mantuvieron a 37° C, con atmósfera al 5% de CO₂ y humedad del 90% en la incubadora, realizando cambio del medio cada tres días. Si la expansión celular provocaba una confluencia del 80-90% de la superficie del frasco de cultivo, se «realizó un pase», es decir, se resuspendieron mediante tripsinización y se dividieron para no frenar el crecimiento celular [13].

Una medida de seguridad empleada para evitar la aparición de células con mutaciones no deseadas fue limitar el tiempo de cultivo de las muestras a seis semanas o, en caso de expansión rápida, un máximo de cuatro pases [14]. En caso de observar una mala evolución del cultivo (senescencia, células no adheridas al plástico, falta de expansión o crecimiento, muerte celular), fue desechado, lo que se consideró como un fracaso del cultivo en el análisis de los resultados. En este estudio únicamente observamos la capacidad de adhesión al plástico y la expansión en cultivo de estas células, sin fijarnos ni en el inmunofenotipo y ni en la diferenciación de las células.

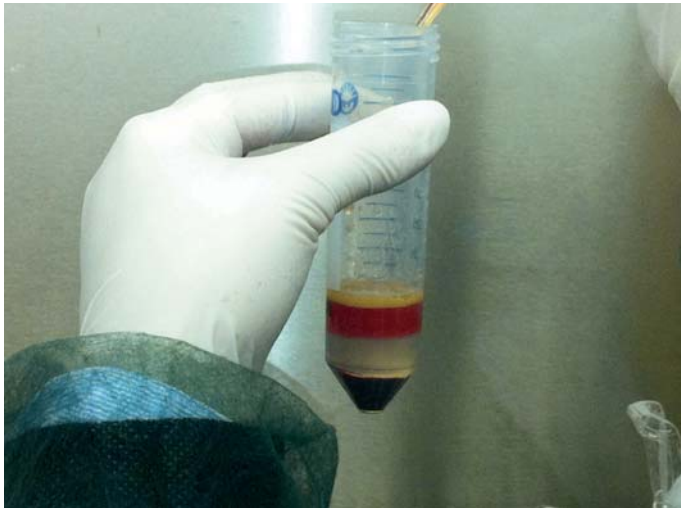


Fig. 3. Muestra de médula ósea de fémur tras realizar separación por gradiente de Ficoll. Obsérvese la gran cantidad de grasa presente en la capa superior de la muestra.

Los datos obtenidos fueron analizados utilizando el programa estadístico SPSS versión 15.0 (IBM statistics), utilizando el test de Wilcoxon para la comparación de los resultados. Considerando la médula ósea de cresta ilíaca como la referencia, realizamos análisis no paramétricos mediante el test de Wilcoxon, comparando las muestras de fémur y tibia con la cresta y respectivamente entre sí.

Resultados

Macroscópicamente, las muestras obtenidas a partir de fémur y tibia presentaron menor densidad y un color más claro que las procedentes de cresta ilíaca. En las dos primeras se observó un sobrenadante de grasa, más importante en las muestras de fémur, que fue necesario eliminar como paso previo a la filtración de las muestras (Figura 3).

La concentración de células mononucleadas obtenida en las diferentes muestras fue de $10,05 \times 10^6$ CMNs/mL en la cresta ilíaca, de $6,7 \times 10^5$ CMNs/mL en el fémur y de $1,7 \times 10^6$ CMNs/mL en la tibia, con una viabilidad celular del 90,95%, 81,18% y 83,63% respectivamente.

Las diferencias fueron estadísticamente significativas en la concentración de CMNs, siendo superior la cresta ilíaca ($p < 0,01$), sin existir diferencias entre el fémur y la tibia. La viabilidad de estas células mononucleadas fue también significativamente superior en cresta ilíaca.

El número final de células estromales mesenquimales (CEMs) obtenidas tras cultivo presentó una mediana de $5,95 \times 10^5$ células para cresta, de $2,90 \times 10^5$ para fémur y de $3,25 \times 10^5$ para tibia, con un tiempo de cultivo medio de 40 días para cresta, 34,2 días para fémur y 31,88 días para tibia.

El análisis no arrojó diferencias significativas en cuanto al número de CEMs obtenidas al final del cultivo y a la capacidad de expansión entre las tres localizaciones. La viabilidad de estas células fue superior en la cresta ilíaca aunque sin alcanzar significación estadística y sin encontrar diferencias al comparar las otras dos localizaciones entre sí.

La media de éxito de los cultivos para cresta fue del 90%, del 71% para fémur y del 47% para tibia. Las diferencias observadas en cuanto al tiempo medio de cultivo estaban relacionadas directamente con la tasa de éxito.

Los parámetros de relevancia analizados fueron concentración y viabilidad de las CMNs y número total y viabilidad de CEMs al final del cultivo.

Discusión

El uso de células madre está cada vez más extendido en el campo de la cirugía ortopédica como tratamiento aislado o como apoyo para un acto quirúrgico [15]. El motivo de realizar el estudio en el contexto de una cirugía de prótesis total de rodilla es minimizar la iatrogenia aprovechando el tipo de anestesia, el área anatómica y las condiciones de esterilidad requeridas para la intervención.

La razón que nos han llevado a realizar esta investigación es encontrar una alternativa a la punción de cresta ilíaca para la obtención de células troncales multipotentes. Existen estudios [16] que demuestran que el uso de injerto esponjoso procedente de tibia presenta buenos resultados para el tratamiento de la pseudoartrosis, y que la cara anterior de la rodilla ofrece una localización accesible durante cualquier cirugía y de bajo riesgo para la punción con respecto a la cresta ilíaca.

Haciendo una revisión bibliográfica, pocos estudios que demuestran la presencia de MSCs en médula ósea de distintas localizaciones y la mayor parte de las publicaciones se refieren a estudios animales [17-19]. Mazzocca *et al.* [20] aspiraron médula ósea de la cabeza humeral de pacientes, durante la reparación artroscópica de manguito rotador, encontrando $12,1 \times 10^6$ CMNs/mL de media en los aspirados de médula ósea, que compararon con los resultados obtenidos por otros autores en aspirados de cuerpo vertebral [21], cresta ilíaca [9] y húmero proximal [22]. Los autores presentaban resultados muy parecidos entre sí, con una concentración media de $17,3 \times 10^6$ CMNs/mL.

Nuestro estudio difiere de estos resultados, siendo la concentración media hallada muy inferior tanto en cresta ilíaca ($10,05 \times 10^6$ CMNs/mL) como en fémur ($6,7 \times 10^5$ CMNs/mL) y tibia ($1,7 \times 10^6$ CMNs/mL), lo que puede ser debido a la elevada edad media de nuestra muestra (71 años), aunque esto no debe afectar a la menor concentración encontrada en la tibia como en el fémur.

Por su parte, De Girolamo *et al.* [23] analizaron 11 pacientes comparando el aspirado de médula ósea procedente de microfracturas realizadas sobre defectos osteocondrales de rodilla con la aspiración de cresta ilíaca. Encontraron que un 0,02% de las células del aspirado del hueso subcondral corresponde a MSCs, frente a un 0,04% presente en cresta ilíaca, y constataron que las primeras solamente pueden ser cultivadas durante unos pocos pases aunque presentan similar capacidad para diferenciación trilineal. Estas conclusiones refuerzan nuestros resultados.

Los resultados obtenidos en nuestro estudio indican una menor concentración de CMNs en el fémur y la tibia con respecto a la cresta ilíaca. Se considera que el número de estas células está correlacionado directamente con la concentración de células madre mesenquimales, por lo que podemos deducir que la concentración de MSCs también será significativamente menor en fémur y tibia con respecto a la cresta ilíaca. Para afirmar con seguridad este hallazgo precisamos aislar la fracción de células troncales mesenquimales, llevando a cabo los procesos necesarios para demostrar su naturaleza mediante cultivo y su caracterización mediante inmunofenotipo, y analizando su capacidad de diferenciación hacia grasa, hueso y cartílago según dicta la ISCT.

Partiendo de un mismo número de células plantadas, el resultado final de CEMs obtenidas tras cultivo y la viabilidad de estas no presentan diferencias estadísticamente significativas en las tres localizaciones, aunque la tasa de éxito de los cultivos es drásticamente inferior en las muestras procedentes de tibia (47%), y ello parece estar correlacionado con la baja viabilidad de las CMNs observada en dichas muestras. Pese a que no existen diferencias significativas entre el fémur y la tibia, este hecho parece indicar una mejor rentabilidad de las muestras procedentes de fémur respecto a tibia.

El estudio presenta varias limitaciones, siendo la principal la avanzada edad de nuestros pacientes. Existen múltiples estudios en los que se demuestra que el número de las células madre presentes en M.O. disminuye con la edad, pero no así sus características. A pesar de no haber tenido ninguna complicación en nuestro estudio, un riesgo potencial de la punción de la metafisis femoral es la posibilidad de artritis séptica, dado que el trayecto del trócar atraviesa una porción intrarticular. Otra limitación, ya referida, es que solo podemos deducir de manera indirecta la relación entre concentración de CMNs y presencia de MSCs.

En conclusión, la médula ósea presente en las metafisis distal de fémur y proximal de tibia tiene una concentración significativamente menor de células mononucleadas respecto a la procedente de cresta ilíaca. La punción-aspiración de las metafisis en torno a la rodilla según la técnica descri-

ta es sencilla y con bajo riesgo. Estamos realizando estudios identificando y caracterizando las células obtenidas tras cultivo de las muestras para poder definir mejor las características y el posible potencial donante de estas localizaciones para la práctica clínica. ■

Agradecimientos

Al equipo del laboratorio de terapia celular del Hospital General Universitario Gregorio Marañón por el análisis y procesado de las muestras y su asesoramiento en el trabajo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Brooke G, Cook M, Blair C, Han R, Heazewood C, Jones B, *et al.* Therapeutic applications of mesenchymal stromal cells. *Semin Cell Dev Biol* 2007; 18:846-58.
2. Owen M, Friedenstein AJ. Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors. *Ciba Found Symp* 1988; 136:42-60.
3. Caplan AI. The mesengenic process. *Clinics Plastic Surg* 1994; 21:429-35.
4. Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, Muller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, *et al.* Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2005; 7:393-5.
5. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Krause D, *et al.* Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006; 8:315-7.
6. Barry FP. Biology and clinical applications of mesenchymal stem cells. *Birth Defects Res C Embryo Today* 2003; 69:250-6.
7. Castro-Malaspina H, Gay RE, Jhanwar SC, Hamilton JA, Chianeri DR, Meyers PA, *et al.* Characteristics of bone marrow fibroblast colony-forming cells (CFU-F) and their progeny in patients with myeloproliferative disorders. *Blood* 1982; 59:1046-54.
8. Jones E, McGonagle D. Human bone marrow mesenchymal stem cells in vivo. *Rheumatology (Oxford)* 2008; 47:126-31.
9. Hernigou P, Poignard A, Beaujean F, Rouard H. Percutaneous autologous bone-marrow grafting for nonunions. Influence of the number and concentration of progenitor cells. *J Bone Joint Surg (Am)* 2005; 87-A:1430-7.
10. Young HE, Steele TA, Bray RA, Hudson J, Floyd JA, Hawkins K, *et al.* Human reserve pluripotent mesenchymal stem cells are present in the connective tissues of skeletal muscle and dermis derived from fetal, adult, and geriatric donors. *Anat Rec* 2001; 264:51-62.

11. 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.
12. Insausti CL, Blanquer MB, Olmo LM, López-Martínez MC, Ruiz XF, Lozano FJ, et al. Isolation and characterization of mesenchymal stem cells from the fat layer on the density gradient separated bone marrow. *Stem Cells Dev* 2011.
13. Brinchmann JE. Expanding autologous multipotent mesenchymal bone marrow stromal cells. *J Neurol Sci* 2008; 265:127-30.
14. Rubio D, García-Castro J, Martín MC, De la Fuente R, Cigudosa JC, Lloyd AC, et al. Spontaneous human adult stem cell transformation. *Cancer Res* 2005; 65:3035-9.
15. Shenaq DS, Rastegar F, Petkovic D, Zhang BQ, He BC, Chen L, et al. Mesenchymal progenitor cells and their orthopedic applications: Forging a path towards clinical trials. *Stem cells Int* 2010; 2010:519028.
16. Owoola AM, Odunubi OO, Yinusa Y, Uregbu MI. Proximal tibial metaphysis: its reliability as a donor site for grafting. *West African J Med* 2010; 29:403-7.
17. Deldar A, Stevens CE, Beineke PJ. Comparative distribution of marrow CFU-e and CFU-gm progenitors in different anatomic sites in the dog. *Int J Cell Cloning* 1990; 8:196-208.
18. Kushida T, Inaba M, Ikebukuro K, Ichioka N, Esumi T, Oyaizu H, et al. Comparison of bone marrow cells harvested from various bones of cynomolgus monkeys at various ages by perfusion or aspiration methods: a preclinical study for human BMT. *Stem Cells* 2002; 20:155-62.
19. Eça LP, Ramalho RB, Oliveira IS, Gomes PO, Pontes P, Ferreira AT, et al. Comparative study of technique to obtain stem cells from bone marrow collection between the iliac crest and the femoral epiphysis in rabbits. *Acta Cir Bras* 2009; 24:400-4.
20. Mazzocca AD, McCarthy MB, Chowanec D, Cote MP, Judson CH, Apostolakos J, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells obtained during arthroscopic rotator cuff repair surgery show potential for tendon cell differentiation after treatment with insulin. *Arthroscopy* 2011; 27:1459-71.
21. McLain RF, Boehm CA, Rufo-Smith C, Muschler GF. Transpedicular aspiration of osteoprogenitor cells from the vertebral body: progenitor cell concentrations affected by serial aspiration. *Spine J* 2009; 9:995-1002.
22. Mazzocca AD, McCarthy MB, Chowanec DM, Cote MP, Arciero RA, Drissi H. Rapid isolation of human stem cells (connective tissue progenitor cells) from the proximal humerus during arthroscopic rotator cuff surgery. *Am J Sports Med* 2010; 38:1438-47.
23. De Girolamo L, Bertolini G, Cervellini M, Sozzi G, Volpi P. Treatment of chondral defects of the knee with one step matrix-assisted technique enhanced by autologous concentrated bone marrow: in vitro characterisation of mesenchymal stem cells from iliac crest and subchondral bone. *Injury* 2010; 41:1172-7.
24. Haniffa MA, Collin MP, Buckley CD, Dazzi F. Mesenchymal stem cells: the fibroblasts' new clothes? *Haematologica* 2009; 94:258-63.

Conflicto de intereses

Los autores hemos recibido ayuda económica de FUNDACIÓN MAPFRE para la realización de este trabajo. No hemos firmado ningún acuerdo por el que vayamos a recibir beneficios u honorarios por parte de alguna entidad comercial o de FUNDACIÓN MAPFRE.