

INVESTIGACIÓN

Uso de células troncales derivadas de lipoaspirado en un modelo experimental animal de rotura de manguito rotador



R. Barco^{a,*}, C. Encinas^a, M. Valencia^a, M.T. Carrascal^b, M. García-Arranz^c y S. Antuña^a

^a Servicio de Cirugía Ortopédica y Traumatología, IDIPAZ, Madrid, España

^b Departamento de Medicina. Escuela Técnica Superior Ingeniería Industrial, UNED, Madrid, España

^c Unidad de Terapia Celular, Instituto de Investigación Sanitaria-Fundación Jiménez Díaz, Madrid, España

Recibido el 19 de mayo de 2014; aceptado el 15 de julio de 2014

Disponible en Internet el 18 de septiembre de 2014

PALABRAS CLAVE

Terapia celular;
Reparación;
Manguito rotador;
Experimental;
Célula troncal
derivada de
lipoaspirado

Resumen

Objetivo: La reparación del manguito rotador tiene una alta tasa de fracaso. Se investiga si la aplicación de células troncales derivadas de lipoaspirado mejorará la resistencia de la reparación y recreará la entesis original.

Material y métodos: Estudio experimental en 44 ratas BDIX con sección y reparación con sutura del tendón supraespinoso y asignación aleatoria a uno de 3 grupos: grupo A, nada (control); grupo B, aplicación local de vehículo de fibrina; y grupo C, aplicación de 2×10^6 células troncales derivadas de lipoaspirado. Se realiza estudio mecánico en célula de carga y estudio histológico en hematoxilina-eosina.

Resultados: En el estudio mecánico no hubo diferencias entre grupos. La carga hasta el fracaso aumentó de los grupos de 4-8 semanas. En el estudio histológico se observó la unión hueso-tendón mediante un tejido fibrovascular desorganizado. En el grupo C se observó un aumento de células plasmáticas a las 4 y 8 semanas.

Conclusión: La utilización de células troncales derivadas de lipoaspirado no recrea la organización celular de la entesis ni mejoran las propiedades biomecánicas de la misma. Son necesarios más estudios para investigar técnicas que mejoren la cicatrización del tendón.

© 2014 SECOT. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

KEYWORDS

Cell therapy;
Repair;
Supraspinatus;
Experimental;

Use of adipose-derived stem cells in an experimental rotator cuff fracture animal model

Abstract

Aim: Rotator cuff repairs have shown a high level of re-ruptures. We hypothesized that the use of adipose-derived stem cells (ASC) could improve the biomechanical and histological properties of the repair.

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: raulbarco@hotmail.com (R. Barco).

Adipose-derived stem-cell

Material and methods: Controlled experimental study conducted on 44 BDIX rats with section and repair of the supraspinatus tendon and randomization to one of three groups: group A, no intervention (control); group B, local applications of a fibrin sealant; and group C, application of the fibrin sealant with 2×10^6 ASC. At 4 and 8 weeks a biomechanical and histological analysis was performed.

Results: There were no differences in load-to-failure at 4 and 8 weeks between groups. The load-to-failure did increase between week 4 and week 8. Histologically the tendon-to bone union showed a disorganized fibrovascular tissue. Group C showed a different inflammatory pattern, with less presence of neutrophils and more presence of plasma cells.

Conclusion: The use of ASC does not improve the biomechanical or histological properties of the repair site. More studies are needed to improve techniques that enhance the healing site of the repair.

© 2014 SECOT. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

Introducción

La existencia de nuevas re-roturas después de la reparación del manguito rotador continúa siendo un problema frecuente. Algunos estudios señalan una incidencia de hasta el 94% en roturas masivas^{1,2}. Además, los resultados funcionales de los pacientes con una reparación íntegra son mejores que aquellos en los que la reparación fracasó³.

La mayor parte de las roturas demuestran cambios degenerativos en la biología local de los tendones que incluyen, entre otros, un incremento en la apoptosis celular y modificaciones en los niveles de metaloproteasas de la matriz y de los distintos factores de crecimiento. La reparación del manguito rotador no consigue recrear la estructura nativa de la entesis ni su resistencia biomecánica original^{4,5}.

Los 2 factores que influyen en la curación de la entesis incluyen la resistencia mecánica de la reparación y el ambiente biológico que influye en la cicatrización. Se ha realizado mucho esfuerzo en aumentar la resistencia mecánica de las reparaciones, sin embargo, existe menos información sobre la modificación del ambiente biológico local mediante el uso de terapias que mejore la cicatrización⁶. El uso de células troncales de origen mesenquimal ha sido una de las estrategias que se ha explorado para aumentar biológicamente estas reparaciones⁷. Las células troncales son células de tipo fibroblástico que son capaces de diferenciarse hacia múltiples tipos celulares incluyendo osteoblastos y condrocitos. Las 2 fuentes principales son la médula ósea y el tejido adiposo, que es más accesible y de mayor poder proliferativo⁸.

Nuestra hipótesis es que la aplicación local de células troncales derivados de lipoaspirado (CTDL) en un modelo animal de manguito rotador mejoraría la resistencia mecánica de la reparación y la estructura histológica de la entesis.

Material y métodos

Para el estudio de las uniones tendón-hueso del modelo de manguito rotador se han empleado un total de 24 ratas sin-génicas BDIX con una edad comprendida entre 6-8 semanas para el estudio biomecánico y 18 animales para el estudio histológico. El estudio fue aprobado por el Comité Ético de

Experimentación animal y se siguieron todas las normas de la legislación internacional para la experimentación animal (86/609/CEE).

Obtención de las células troncales derivadas de lipoaspirado (Apéndice A)

El método para obtener células troncales derivadas de lipoaspirado ha sido publicado previamente⁹. Brevemente, las células fueron extraídas del epiplón y grasa subcutánea de 2 animales y se les practicó un método de disgregación mecánica y digestión celular enzimática. Seguidamente se seleccionó la fase celular, aislándose las células troncales. Se comprobó la estirpe celular mediante la diferenciación de las células a adipocitos, condrocitos y osteocitos y mediante estudios de citometría de flujo de los marcadores de membrana (CD 90, CD 73 y CD 105 positivos y CD 34, CD 44 negativos). Con posterioridad se expandió las células en un medio adecuado y se realizó el recuento celular previamente a la aplicación.

Técnica quirúrgica

La técnica quirúrgica ha sido descrita con anterioridad¹⁰. Brevemente, a los animales se les practicó una incisión longitudinal sobre la parte proximal de la pata delantera con una sección horizontal del deltoides, exponiendo el manguito rotador de la rata. Se les practicó la sección del tendón del supraespinoso del troquíter y se aleatorizó a uno de 3 grupos por un sistema generado electrónicamente (Excel, Microsoft, Redmond, VA, EE. UU.). El primer grupo consistió en la reparación del tendón supraespinoso al troquíter a través de un túnel óseo anteroposterior utilizando una sutura irreabsorbible monofilamento de 5/0. El segundo grupo consistió en una reparación idéntica con un vehículo de fibrina aplicado sobre la zona de reparación (Tissucol, Baxter, Deerfield, IL, EE. UU.). El tercer grupo consistió en la reparación tendinosa y aplicación de 2×10^6 células troncales embebidas en el vehículo de fibrina. Después de la asignación al tipo del grupo experimental se realizó el cierre del deltoides con sutura reabsorbible y el cierre de la piel con sutura de seda 3/0.

Tabla 1 Resultados biomecánicos de la reparación del tendón del supraespinoso a las 4 semanas

Grupo	Carga hasta el fracaso (n)	Deformidad máxima (mm)	Rigidez (n/mm)	Energía absorbida (J)
Control	12,83 ± 3,79	3,99 ± 2,11	5,27 ± 3,11	0,069 ± 0,035
Fibrina	11,57 ± 2,08	4,21 ± 1,72	3,50 ± 1,68	0,051 ± 0,019
CMDL	11,72 ± 3,98	5,13 ± 1,78	2,93 ± 1,07	0,080 ± 0,080
p	0,67	0,41	0,11	0,47

Estudio histológico y biomecánico (Apéndice B)

Los animales fueron sacrificados a las 4 y las 8 semanas después de la reparación. Para preparar los especímenes para el estudio biomecánico se individualizó la escápula, la unidad miotendinosa supraespinosa y el húmero y se introdujo en una jeringa de 2 ml en un medio de cemento óseo de polimetilmetacrilato (PMMA) (CMW-1, De-Puy, Johnson & Johnson, Warsaw, IN, EE. UU.) para poder incluirla en una célula de carga electrohidráulica lineal (ControlTest, Servosis, Madrid, España). Los especímenes se precargaban a 0,1 N y se probaban hasta el fracaso a una velocidad de 14 micras/s. Se recogió la carga máxima hasta el fracaso y el sitio de fracaso. La rigidez de la muestra se calculó determinando la parte lineal de la pendiente ascendente de la curva de carga-desplazamiento⁷.

Para el estudio histológico se individualizó la escápula y miembro superior hasta el codo y se fijó en una solución de formalina al 10%, se descalcificó con una solución decalcificante (EDTA) y se embebió en parafina para la realización de los cortes histológicos. Se realizaron cortes de 5 micras en el plano coronal y se tiñeron con hematoxilina y eosina. El estudio histológico se realizó por un patólogo que desconocía el grupo experimental al que pertenecía la muestra. Se realizó el estudio en 2 momentos diferentes para dar mayor homogeneidad al estudio. Cuando hubo discrepancias se realizó una tercera lectura del estudio. Se prestó especial interés el troquíter, la inserción de la reparación tendón-hueso y el tendón supraespinoso *per se* utilizando un microscopio óptico. Se procedió al estudio de las cualidades histológicas microscópicas como infiltrado inflamatorio, vascularización y organización celular y fibrilar de la entesis.

Resultados

Dos animales fallecieron a consecuencia de complicaciones anestésicas y fueron repuestos para completar el número experimental predeterminado. Todos los animales habían conseguido una marcha normal a los 7 días de la intervención. No hubo otras complicaciones postoperatorias.

En el estudio biomecánico no hubo diferencias significativas entre ninguno de los grupos para ninguna de las

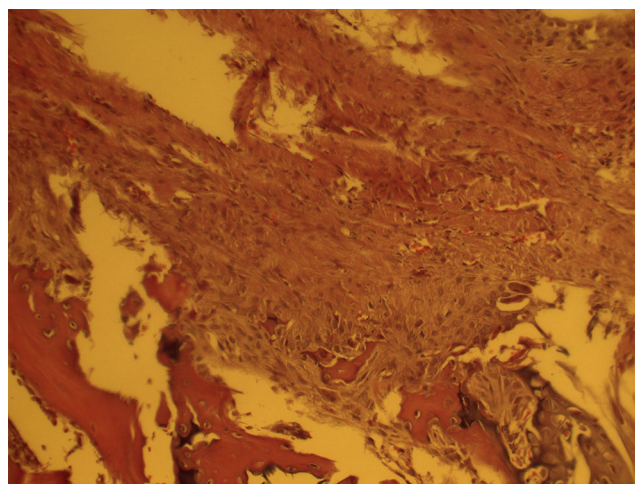


Figura 1 Corte histológico (hematoxilina-eosina, x40) de la entesis con 4 semanas de evolución. La entesis aparece altamente celular y muy desorganizada.

variables estudiadas. La carga hasta el fracaso media fue de 12,83 N para el grupo 1, 11,57 N para el grupo 2 y 11,72 para el grupo 3 a las 4 semanas (p=0,67) (tabla 1). En el grupo analizado a las 8 semanas la carga hasta el fracaso fue de 15,11 N para el grupo 1, 15,94 N para el grupo 2 y 14,35 N para el grupo 3 (p=0,88) (tabla 2).

El examen de necropsia no reveló diferencias significativas entre los grupos de estudio, si bien se apreciaba una mayor robustez del tejido en los grupos sacrificados a las 8 semanas comparados con los de 4 semanas de evolución.

En el estudio histológico se observó una entesis inmadura en los grupos de 4 semanas de evolución con una estructura más desorganizada y altamente celular con abundancia de células inflamatorias, en comparación con los grupos de 8 semanas de evolución que presentaban una estructura algo más organizada con una mejor alineación de las fibras de colágeno sin diferencias entre grupos (fig. 1). Las muestras analizadas con células mesenquimales únicamente presentaban una menor respuesta inflamatoria a las 4 semanas aunque no realizamos ningún estudio adicional para cuantificar esa diferencia. Esta diferencia desaparecía en los grupos

Tabla 2 Resultados biomecánicos de la reparación del tendón del supraespinoso a las 8 semanas

Grupo	Carga hasta el fracaso (n)	Deformidad máxima (mm)	Rigidez (n/mm)	Energía absorbida (J)
Control	15,11 ± 5,75	8,32 ± 4,83	4,10 ± 1,90	0,120 ± 0,051
Fibrina	15,94 ± 5,50	5,09 ± 3,10	4,30 ± 1,94	0,079 ± 0,067
CMDL	14,35 ± 4,16	6,46 ± 1,69	3,53 ± 1,61	0,096 ± 0,37
p	0,88	0,23	0,79	0,33

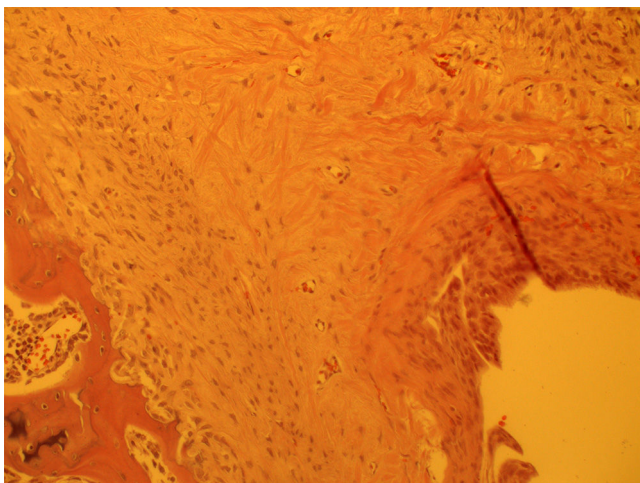


Figura 2 Corte histológico (hematoxilina-eosina, x40) de la entesis con 8 semanas de evolución. La estructura fibrilar de la entesis tiene una disposición más organizada aunque todavía carece de la orientación paralela de la entesis nativa.

a las 8 semanas (fig. 2). Se observó la presencia de células marcadas con proteína verde fluorescente a las 4 semanas.

Discusión

La alta tasa de fracaso tras la reparación quirúrgica ha planteado la existencia de un problema biológico intrínseco del tendón. La entesis no se regenera con la reparación quirúrgica sino que es sustituida por un tejido cicatricial con menor resistencia mecánica que el tejido nativo lo cual puede predisponer al mismo a sufrir nuevas roturas⁵. El objetivo de las terapias biológicas es mejorar el entorno biológico alrededor de la reparación para restaurar la estructura microscópica de la inserción nativa. Se han utilizado factores de crecimiento y matrices extracelulares con resultados modestos¹¹⁻¹⁵. La terapia celular podría desempeñar un papel importante en el tratamiento de lesiones de los tendones del manguito rotador^{7,16,17}.

El presente trabajo planteaba la hipótesis de que la aplicación local de células troncales derivadas de lipoaspirado mejoraría la resistencia biomecánica de la reparación como consecuencia de una organización celular mejorada. Sin embargo, los resultados del estudio no apoyan esta hipótesis.

Las células madre mesenquimales provenientes de médula ósea han mejorado la cicatrización de tendón al hueso en modelos experimentales previos de ligamento cruzado de rodilla y de *flexor hallucis longus* en conejos^{16,17}. El uso aislado de células madre derivadas de médula ósea aisladas no mejoraba la histología ni las propiedades biomecánicas de una reparación del manguito rotador en ratas. Las posibles causas aducidas incluían la existencia de un área de contacto pequeña entre el tendón y el hueso, la no existencia de una inmovilización postoperatoria y la posible insuficiente señalización molecular necesaria para lograr la cicatrización de un área tan compleja, lo cual señala la complejidad biológica de la reparación de estas lesiones. La utilización de varias terapias biológicas combinadas parecen mejorar los resultados biomecánicos e histológicos^{7,18,19}.

Las CTDL son accesibles fácilmente mediante una lipoaspiración, genéticamente estables, con un potencial proliferativo casi ilimitado e inmunoprivilegiadas al carecer del haplotipo HLA-DR. Guilak et al. han demostrado que estas células son capaces de reducir la inflamación, de diferenciarse y de inducir la revascularización²⁰. En estudios en humanos han demostrado ser seguras y eficaces en el tratamiento de fístulas perianales y traqueoesofágicas^{21,22}. No hemos observado complicaciones derivadas del uso de las células troncales y confirma la experiencia de otros autores^{23,24}. Asumiendo una igualdad de resultados con las células madre derivadas de médula ósea, estas ventajas las hacen atractivas para su uso en la reparación del manguito rotador.

Las CTDL en nuestro modelo experimental no han mejorado la resistencia mecánica de la reparación ni la apariencia histológica de las mismas. A pesar de que algunos autores sugerían la posible influencia de las células mesenquimales a las 8 semanas de evolución, nosotros no hemos sido capaces de demostrar ninguna diferencia⁷. Tampoco encontramos diferencias significativas a las 4 semanas. Quizá un análisis a las 2 semanas demostrara una diferencia que nosotros no hemos podido detectar. El número de células utilizado ha sido igual a otros modelos utilizados y validados previamente pero existe la posibilidad de que el número de células sea insuficiente o bien que el sitio de reparación carezca de las señales moleculares necesarias para inducir la diferenciación de las células que aplicamos^{7,13,16}. Otros autores han señalado la dificultad en conocer la dosis correcta y el vehículo adecuado para conseguir una verdadera regeneración tendinosa y no una cicatrización de la entesis²⁵. Es posible que la dispersión de las células en un vehículo de fibrina no sea capaz de contener a las células localmente o que la dosis utilizada sea insuficiente o bien, que la complejidad de las señales moleculares necesarias para la reparación sin cicatriz no pueda ser reproducida con la adición de células aisladamente.

Son necesarios más estudios dedicados a combinar distintos inductores de la diferenciación celular para aumentar nuestro conocimiento actual sobre las particularidades de la cicatrización del manguito rotador.

Nivel de evidencia

Nivel de evidencia I.

Responsabilidades éticas

Protección de personas y animales. Los autores declaran que los procedimientos seguidos se conformaron a las normas éticas del comité de experimentación humana responsable y de acuerdo con la Asociación Médica Mundial y la Declaración de Helsinki.

Confidencialidad de los datos. Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

Derecho a la privacidad y consentimiento informado. Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

Financiación

Este proyecto ha sido financiado con una beca de la Sociedad Española de Cirugía Ortopédica y Traumatología (Beca N.º BE67322009).

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Apéndice A. Obtención y cultivo de las células troncales derivadas de lipoaspirado

Las células fueron obtenidas del tejido graso de 2 ratas adicionales de acuerdo a un protocolo descrito en humanos con modificaciones mínimas²⁴. Brevemente, el lipoaspirado se lavó con suero salino tamponado con fosfato (PBS; Gibco, Invitrogen, Paisley, Reino Unido) y expuestas a 37 °C durante 30 minutos a colágenas (tipo I; Gibco, Invitrogen). La actividad enzimática se neutralizó con la adición de suero bovino fetal al 10% (FBS; Gibco) y la mezcla obtenida se centrifugó a 300 G durante 10 minutos. El remanente celular se trató con 160 mM clorhidrato de amonio durante 10 minutos para provocar la lisis de cualquier eritrocito restante. Las células se lavaron y se suspendieron en un medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) y un 10% de suero bovino fetal. Se llevó a cabo una tercera centrifugación y la suspensión celular resultante se filtró por un malla de nylon de 70 µm. Posteriormente, el material obtenido se suspendió en un medio DMEM con glucosa y piruvato, suero bovino fetal al 10%, 2 mM de glutamina al 1%, estreptomycin 10 µg/ml y penicilina 1 UI/ml. El producto obtenido se denominó fracción estromal vascular (VSF). Estas células fueron cultivadas en bandejas de 100 mm con una concentración de 10-15 cels/ml a una temperatura de 37 °C en una atmósfera húmeda con un 5% de dióxido de carbono en un medio de DMEM con FBS al 10% y estreptomycin/penicilina al 1% (Gibco, BRL). El medio se cambió para retirar células no adheridas 24 horas después de la incorporación en la bandeja y luego cada 4 días. Par cultivos derivados las células se disgregaban con tripsina (v7 v) al 0,05% en un salino tamponado con fosfato cuando se lograba una confluencia celular del 70-80%. Se realizaban estudios de caracterización celular por citometría de flujo analizando la expresión de los marcadores de superficie CD90, CD29, CD45 y CD11b para confirmar el fenotipo de ASC de las células cultivadas.

Se realizó un marcaje celular con proteína verde fluorescente (GFP) para el marcaje celular siguiendo las indicaciones del fabricante.

Apéndice B. Análisis histológico

En los tiempos predeterminados se realizó la eutanasia con una inyección intracardiaca de potasio clorhídrico bajo anestesia general y se obtenían los especímenes para el estudio histológico. El espécimen consistía en la articulación glenohumeral completa incluyendo el músculo deltoides. Se fijaba mediante una solución de formaldehído al 4% y se descalcificaba en una solución EDTA durante 14-21 días y se embebía en parafina. Las muestras se analizaban en un microscopio óptico convencional. Las muestras marcadas con proteína

verde fluorescente se analizaron con un microscopio invertido Leyca DMI 6000.

B. 1. Análisis biomecánico

1. Preparación de las muestras. Existían 3 grupos comparables en peso preoperatoriamente y en el momento del sacrificio. A las 4 y 8 semanas se practicó la eutanasia con una inyección intracardiaca de potasio clorhídrico bajo anestesia general y se obtenían los especímenes para el estudio biomecánico. Cada muestra se disecó para aislar la escápula el húmero y el tendón supraespinoso. El húmero se colocaba en una jeringa de 2 mL y se fijaba con cemento de polimetilmetacrilato. Durante la polimerización del cemento y para evitar el daño producido por los efectos exotérmicos de dicha reacción el tendón era protegido en una solución salina. Los especímenes fueron congelados a una temperatura de -80 °C en el momento del análisis biomecánico y se descongelaban a temperatura ambiente doce horas antes del ensayo.
2. Ensayo biomecánico. El ensayo biomecánico se realizó en un aparato electromecánico específico consistente en un codificador lineal con un sensor de posición y 2 células de carga de 20 N y 200 N calibrado para la detección de pequeñas cargas. Los datos se registraban en el programa de software específico (PCD-2K) diseñado para Windows 7 obteniendo curvas de tensión-deformación, y realizando cálculos de la carga máxima hasta el fracaso (N), rigidez (N/mm²), energía absorbida (J) y deformación máxima (mm). La escápula se aseguraba en una de las células de carga con un soporte para permitir alinear el tendón con la dirección de carga apropiada. Los especímenes se precargaban a 0, 10 N y luego se cargaban hasta el fracaso del tendón a una tasa de 14 µs⁻¹.

Bibliografía

1. Galatz LMBC, Teefey SA, Middleton WD, Yamaguchi K. The outcome and repair integrity of completely arthroscopically repaired large and massive rotator cuff tears. *J Bone Joint Surg Am.* 2004;86-A:219-24.
2. Boileau P, Brassart N, Watkinson DJ, Carles M, Hatzidakis AM, Krishnan SG. Arthroscopic repair of full-thickness tears of the supraspinatus: Does the tendon really heal? *J Bone Joint Surg Am.* 2005;87:1229-40.
3. Gerber C, Fuchs B, Hodler J. The results of repair of massive tears of the rotator cuff. *J Bone Joint Surg Am.* 2000; 82:505-15.
4. Carpenter JE, Thomopoulos S, Flanagan CL, DeBano CM, Soslowsky LJ. Rotator cuff defect healing: A biomechanical and histologic analysis in an animal model. *J Shoulder Elbow Surg.* 1998;7:599-605.
5. Galatz LM, Sandell LJ, Rothermich SY, Das R, Mastny A, Havlioglu N, et al. Characteristics of the rat supraspinatus tendon during tendon-to-bone healing after acute injury. *J Orthop Res.* 2006;24:541-50.
6. Rodeo SA. Biologic augmentation of rotator cuff tendon repair. *J Shoulder Elbow Surg.* 2007;16 5 Suppl:S191-7.
7. Gulotta LV, Kovacevic D, Ehteshami JR, Dagher E, Packer JD, Rodeo SA. Application of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in a rotator cuff repair model. *Am J Sports Med.* 2009;37:2126-33.
8. Ruiz-Ibán MÁ, Díaz-Heredia J, García-Gómez I, Gonzalez-Lizán F, Elías-Martín E, Abreira V. The effect of the addition of

- adipose-derived mesenchymal stem cells to a meniscal repair in the avascular zone: An experimental study in rabbits. *Arthroscopy*. 2011;27:1688–96.
9. García-Olmo D, García-Arranz M, García LG, Cuellar ES, Blanco IF, Prianes LA, et al. Autologous stem cell transplantation for treatment of rectovaginal fistula in perianal Crohn's disease: A new cell-based therapy. *Int J Colorectal Dis*. 2003;18.
 10. Thomopoulos S, Hattersley G, Rosen V, Mertens M, Galatz L, Williams GR, et al. The localized expression of extracellular matrix components in healing tendon insertion sites: An in situ hybridization study. *J Orthop Res*. 2002;20:454–63.
 11. Antuna S, Barco R, Martínez Diez JM, Sánchez Márquez JM. Platelet-rich fibrin in arthroscopic repair of massive rotator cuff tears: A prospective randomized pilot clinical trial. *Acta Orthop Belg*. 2013;79:25–30.
 12. Rodeo SA, Delos D, Williams RJ, Adler RS, Pearle A, Warren RF. The effect of platelet-rich fibrin matrix on rotator cuff tendon healing: A prospective, randomized clinical study. *Am J Sports Med*. 2012;40:1234–41.
 13. Kovacevic D, Rodeo SA. Biological augmentation of rotator cuff tendon repair. *Clin Orthop Relat Res*. 2008;466:622–33.
 14. Iannotti JP, Codsí MJ, Kwon YW, Derwin K, Ciccone J, Brems JJ. Porcine small intestine submucosa augmentation of surgical repair of chronic two-tendon rotator cuff tears. A randomized, controlled trial. *J Bone Joint Surg Am*. 2006;88:1238–44.
 15. Aurora A, McCarron J, Iannotti JP, Derwin K. Commercially available extracellular matrix materials for rotator cuff repairs: State of the art and future trends. *J Shoulder Elbow Surg*. 2007;16 5 Suppl:S171–8.
 16. Lim JK, Hui J, Li L, Thambyah A, Goh J, Lee EH. Enhancement of tendon graft osteointegration using mesenchymal stem cells in a rabbit model of anterior cruciate ligament reconstruction. *Arthroscopy*. 2004;20:899–910.
 17. Ouyang HW, Goh JC, Lee EH. Use of bone marrow stromal cells for tendon graft-to-bone healing: Histological and immunohistochemical studies in a rabbit model. *Am J Sports Med*. 2004;32:321–7.
 18. Gulotta LV, Kovacevic D, Montgomery S, Ehteshami JR, Packer JD, Rodeo SA. Stem cells genetically modified with the developmental gene MT1-MMP improve regeneration of the supraspinatus tendon-to-bone insertion site. *Am J Sports Med*. 2010;38:1429–37.
 19. Gulotta LV, Kovacevic D, Packer JD, Deng XH, Rodeo SA. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells transduced with scleraxis improve rotator cuff healing in a rat model. *Am J Sports Med*. 2011;39:1282–9.
 20. Guilak F, Estes BT, Diekmann BO, Moutos FT, Gimple JM, Nicolas Andry Award: Multipotent adult stem cells from adipose tissue for musculoskeletal tissue engineering. *Clin Orthop Relat Res*. 2010;2010:2530–40.
 21. García-Olmo D, Herreros D, Pascual I, Pascual JA, del-Valle E, Zorrilla J, et al. Expanded adipose-derived stem cells for the treatment of complex perianal fistula: A phase II clinical trial. *Dis Colon Rectum*. 2009;52:79–86.
 22. Alvarez PD, García-Arranz M, Georgiev-Hristov T, García-Olmo D. A new bronchoscopic treatment of tracheomediastinal fistula using autologous adipose-derived stem cells. *Thorax*. 2008;63:374–6.
 23. Mitchell JB, McIntosh K, Zvonic S, Garrett S, Floyd ZE, Kloster A, et al. Immunophenotype of human adipose-derived cells: Temporal changes in stromal-associated and stem cell-associated markers. *Stem Cells*. 2006;24:376–85.
 24. González-Rey E, González MA, Varela N, O'Valle F, Hernández-Cortés P, Rico L, et al. Human adipose-derived mesenchymal stem cells reduce inflammatory and T cell responses and induce regulatory T cells in vitro in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2010;69:241–8.
 25. Arce G, Bak K, Bain G, Calvo E, Ejnisman B, di Giacomo VG, et al. Management of disorders of the rotator cuff: Proceedings of the ISAKOS upper extremity committee consensus meeting. *Arthroscopy*. 2013;29:1840–50.