

INVESTIGACIÓN

# Defectos osteocondrales tratados con inoculación de células progenitoras o condrocitos autólogos

## Modelo en conejos

\*SANTIAGO BOSIO, \*\*, \*\*CECILIA PASCUAL GARRIDO, \*\*\*ALEJANDRO ROLÓN, \*ARTURO MAKINO y \*D. LUIS MUSCOLO

*\*Instituto de Ortopedia Carlos E Ottolenghi, \*\*Instituto de Ciencias Básicas y Medicina Experimental y \*\*\*Servicio de Diagnóstico por Imágenes, Hospital Italiano de Buenos Aires*

### RESUMEN

**Introducción:** El mejor tratamiento para las lesiones osteocondrales aún se desconoce. Los resultados clínicos con el injerto de condrocitos autólogos son favorables (90% éxito a 10 años); sin embargo, su capacidad de regenerar un cartílago hialino adulto continúa siendo controversial. La capacidad pluripotencial de las células progenitoras determina probablemente la posibilidad de regenerar el cartílago articular y el hueso subcondral subyacente.

El objetivo es establecer si la regeneración del cartílago es hialina luego de la inoculación de células progenitoras adultas o condrocitos autólogos en las lesiones osteocondrales de la rodilla.

**Materiales y métodos:** Se utilizaron 10 conejos en los cuales se creó un defecto osteocondral en ambas rodillas. Luego se los dividió en dos grupos: un grupo control, que no recibió tratamiento (10 rodillas izquierdas) y un grupo estudio (10 rodillas derechas), dentro del cual 5 recibieron células progenitoras autólogas y 5, condrocitos autólogos. A los ocho meses de la operación se sacrificó a los animales previa evaluación con resonancia magnética tridimensional. Las piezas fueron evaluadas con tinción de hematoxilina-eosina y con inmunohistoquímica para colágeno tipo II.

**Resultados:** Los defectos sin tratamiento presentaron un tejido degenerativo fibrocartilaginoso. Los tratados con

líneas celulares demostraron un estímulo regenerativo, pero sin evidenciar un cartílago hialino adulto similar al cartílago nativo adyacente. Las células progenitoras demostraron una mejor regeneración del hueso subcondral.

**Conclusiones:** Los tratamientos con líneas celulares demuestran un estímulo regenerativo en las lesiones osteocondrales; sin embargo, no se logra un cartílago articular hialino similar al nativo. Tal vez sea necesario incorporar a estas terapias otras herramientas de la ingeniería de tejidos, como las matrices tridimensionales y los factores de crecimiento, que puedan lograr una regeneración *ad integrum* del cartílago articular hialino.

**PALABRAS CLAVE:** Condrocitos. Células progenitoras. Cartílago.

**OSTEOCHONDRAL DEFECTS TREATED WITH AUTOLOGOUS CHONDROCYTE IMPLANTATION OR PROGENITOR CELLS. RABBIT MODEL**

### ABSTRACT

**Background:** The best treatment for osteochondral defects is still unknown. Good clinical results have been seen on patients treated with autologous chondrocytes implantation (90% good results at 10 years). However, not everybody agrees that they do really generate hyaline cartilage. Mesenchymal stem cells are a new source of cell repair. Its advantages are related to its multipotential capacity that probably allows cartilage and subchondral bone regeneration.

The aim of this study is to assess whether osteochondral defects treated with autologous chondrocyte implantation or progenitor cells inoculation can regenerate with hyaline cartilage.

**Methods:** Ten 8-months old California rabbits were used. They were divided randomly in two groups. Right knees served as the study group (Group A: N5 ACI-Group B: N5 Stem Cells) and left knees (N: 10) as the

Recibido el 22-6-2006. Aceptado luego de la evaluación el 28-7-2006.

Correspondencia:

Dra. CECILIA PASCUAL GARRIDO

Potosí 4215

(C1199 ACK) - Buenos Aires

Tel.: 4958-4011

cecilia.pascualgarrido@hospitalitaliano.org.ar

controls. Before animals were euthanized a 3D MRI for cartilage was taken in both knees. Specimens were evaluated using Hematoxylin and Eosin, and Immunohistochemistry for Collagen Type 2 using the ICRS score system (4).

**Results:** Both cell lines determined cartilage regeneration stimulation. However, the cartilage was not identical to the adult hyaline type. Progenitor cells showed a better regeneration of subchondral bone. Osteochondral defects presented fibrocartilage.

**Conclusions:** The control group showed regenerative tissue with fibrocartilage. Those treated with cells evidenced regenerative tissue but without an adult hyaline type identical to native cartilage. Cell selection, scaffold design and biological stimulation remain a challenge for tissue engineering. Successful regeneration of damaged, diseased cartilage will depend on future advances in our understanding of the biology of cartilage and stem cells, and technological developments in engineering.

**KEY WORDS: Chondrocytes. Stem cells. Cartilage.**

Las lesiones del cartílago articular tienen baja capacidad regenerativa. Si bien se describieron numerosos procedimientos para el tratamiento de las lesiones osteocondrales, no se ha establecido ninguno como estándar en este tipo de patología; el mejor tratamiento para los defectos osteocondrales aún está por descubrirse.<sup>14</sup> Se han intentado distintos procedimientos de carácter biológico a fin de lograr la regeneración del cartílago hialino adulto.

El área de interés desarrollada en los últimos años en la ingeniería de tejidos ha determinado a esta última como probable fuente terapéutica en la regeneración de las lesiones del cartílago articular.

En 1994 se informaron los primeros resultados clínicos del trasplante de condrocitos autólogos humanos cultivados en monocapa.<sup>4</sup> Sus resultados han sido alentadores; sin embargo, existen ciertos cuestionamientos en cuanto a la posibilidad de inducir cartílago hialino. Diferentes estudios histológicos han demostrado la capacidad de regenerar cartílago hialino en las capas más profundas del cartílago articular, no así en la zona superficial.<sup>2</sup> Asimismo, la desdiferenciación que sufren estas células al ser cultivadas en monocapa genera en ellas una alteración metabólica que probablemente altere su comportamiento biológico cuando se las inoculara.

La utilización de las células progenitoras como fuente reparadora de diferentes lesiones musculoesqueléticas ha sido propuesta por numerosos autores.<sup>7</sup> Su capacidad pluripotencial puede ofrecer un efecto regenerativo en el cartílago articular y en el hueso subcondral subyacente,<sup>16</sup> que daría una mejor viabilidad al injerto.

El objetivo de este trabajo es evaluar la capacidad regenerativa de estas dos líneas celulares en defectos osteocondrales en conejos.

## Materiales y métodos

Fueron intervenidos 10 conejos californianos, de 8 meses de edad, para crearles un defecto en el cóndilo medial de ambas rodillas. Luego se los agrupó en forma aleatoria en dos grupos: grupo A: condrocitos autólogos (5 rodillas derechas) y grupo B: células progenitoras (5 rodillas derechas). Las rodillas izquierdas fueron utilizadas como controles. Los condrocitos autólogos se obtuvieron mediante una biopsia de cartílago durante la realización del defecto osteocondral, expandido y se los recolocó al cabo de 4 semanas en la zona del defecto utilizando la técnica descrita por Brittberg<sup>4</sup> (grupo A). Las células progenitoras obtenidas de la punción de la cresta ilíaca fueron expandidas e inoculadas al cabo de 4 semanas (grupo B). Ocho meses más tarde se sacrificó a los animales previa evaluación con resonancia magnética tridimensional para cartílago articular mediante un resonador Philips Gyroscan Intera Release 9,0 de 1,5 Tesla (secuencia 3D FFE SPIR-Matrix 256 x 256-slice 1,5 mm-Fov 150 mm). Se utilizó como clasificación un puntaje del 1 a 4, siendo 1 el mejor resultado y 4, el peor. El grado de relleno del defecto fue clasificado como completo (1); > 50% (2); < 50% (3) o falta de relleno (4). La señal de intensidad en la zona de reparación fue clasificada normal (1, idéntica al cartílago adyacente), casi normal (2, pequeñas zonas de hipointensidad), anormal (3, elevadas zonas de hipointensidad), severamente anormal (4, ausente). El edema óseo fue clasificado ausente (1), poco (2), moderado (3) y severo (4) (Tabla 1). Se determinó una escala final a través del peor puntaje de los tres parámetros.<sup>15</sup>

La evaluación fue realizada de manera ciega por un único especialista en imágenes musculoesqueléticas (A. R).

Luego las piezas fueron preservadas en formaldehído al 4%, procesadas y embebidas en parafina. Se procedió a realizar los cortes en paralelo con 3 µm de grosor. Se realizaron las tinciones con hematoxilina y eosina e inmunohistoquímica para colágeno tipo II. Se las clasificó de acuerdo con la escala ICRS (Sociedad Internacional de Reparación del Cartílago) evaluando la capacidad de regeneración según el porcentaje de reparación del defecto, la integración del injerto con el cartílago adyacente y el aspecto macroscópico. Estas piezas fueron evaluadas de manera ciega en tres muestras consecutivas (Fig. 1).

**Tabla 1.** Escala utilizada para evaluar los resultados con resonancia magnética

Intensidad	Relleno	Edema
1 Normal	1 Completo	1 Ausente
2 Casi normal	2 > 50%	2 Poco
3 Anormal	3 < 50%	3 Moderado
4 Severamente anormal	4 Faltante	4 Severo

## Resultados

### Resonancia magnética

En el grupo control (rodilla izquierda,  $n = 10$ ) se constató la falta de regeneración hialina en los defectos osteocondrales. Se evidenció la presencia de un tejido tipo fibroso, hipointenso, que alteró la anatomía del cóndilo femoral (Fig. 2). Los defectos presentaron una escala radiológica tipo 3,7, según la escala utilizada. Los resultados de los estudios por resonancia magnética se sintetizan en la tabla 2.

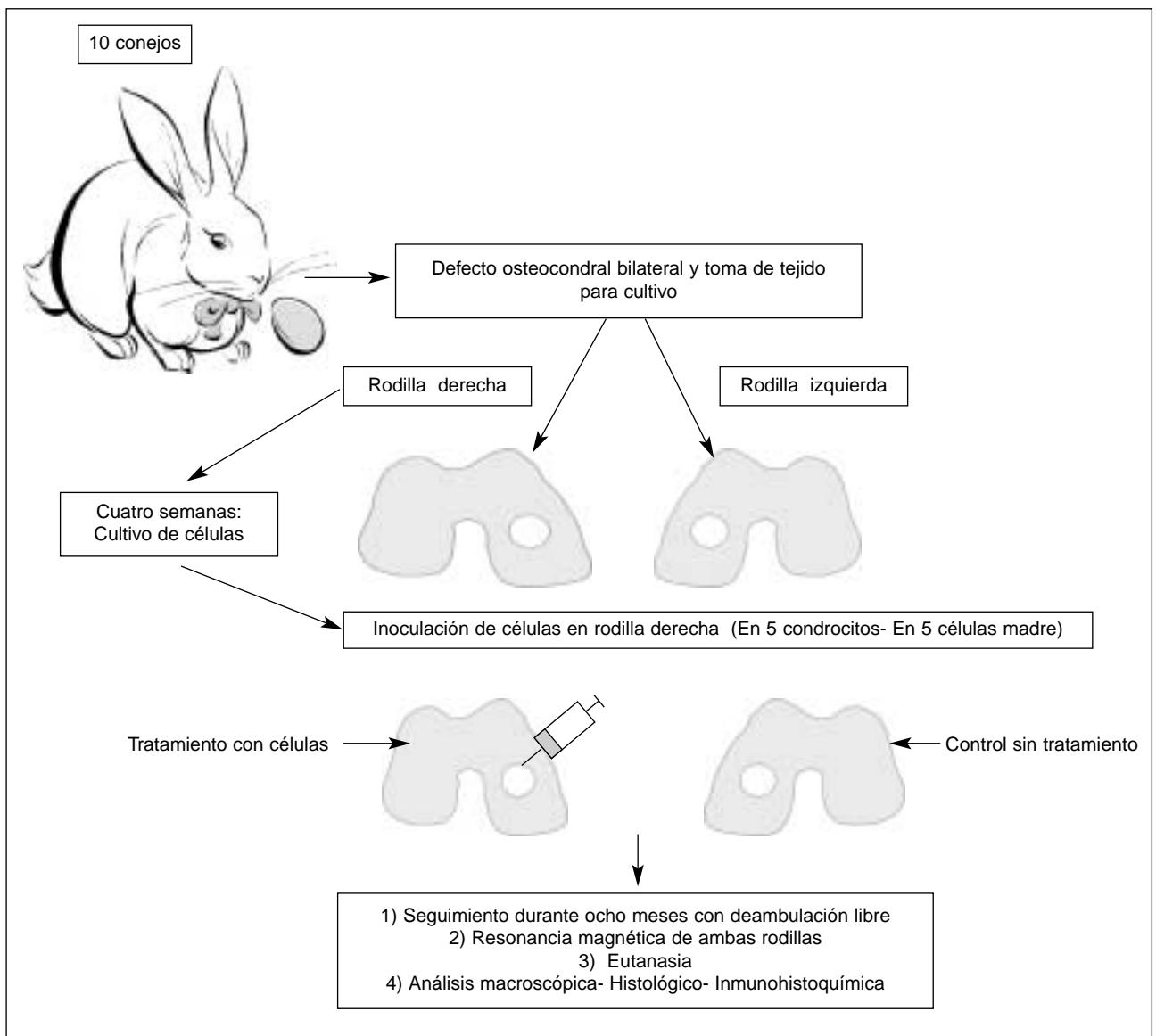
En el grupo estudio (rodilla derecha,  $n = 10$ ) se constató la persistencia de edema óseo, la intensidad en la zona

de regeneración siempre fue menor con respecto al cartílago adyacente; sin embargo, fue mejor que la observada en el grupo control (Fig. 3). Los defectos presentaron una mayor capacidad de relleno (Tabla 3) ( $p < 0,0004$ ).

Las diferencias entre ambas líneas celulares se resumen en la tabla 4 ( $p > 0,05$ ).

### Análisis macroscópicos histológicos

Ocho meses después de la implantación, el grupo control presentó un tejido degenerado, con colapso de la zona donde se había realizado el defecto osteocondral. Asimismo, el cartílago de reparación evidenció las características de un tejido fibrocartilaginoso blanco fibroso. En



**Figura 1.** Esquematización del diseño experimental utilizado.

la figura 4 se observa el comportamiento del cartílago articular adulto ante un estímulo lesional sin tratamiento. Se corrobora un tejido fibroso blanco anacarado. En ciertas piezas se pudo confirmar la reabsorción de la zona lesionada con la generación de una grieta o fisura.

Histológicamente, se constataron defectos osteocondrales rellenos en menos del 20% con un tejido tipo fibroso. La superficie articular presentaba fibrilaciones com-

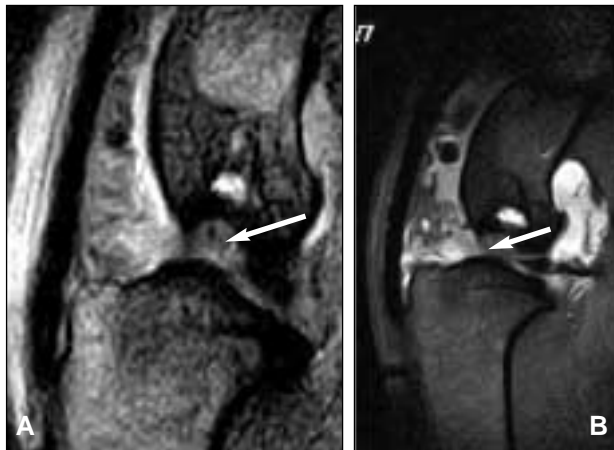
patibles con un cartílago en degeneración (Fig. 5). La expresión de colágeno tipo II fue negativa, por lo que se infirió de manera específica la ausencia de cartílago hialino (Fig. 6). En la tabla 5 se presentan los resultados observados en las lesiones sin tratamiento según la clasificación de la Sociedad Internacional del Cartílago (ICRS). Obsérvese que el punto de integración no fue evaluado, ya que en este grupo no se realizó ningún tipo de injerto. El tejido fue clasificado como anormal o severamente anormal (puntaje rango 3-1 de la ICRS).

A los 8 meses de la implantación el grupo estudio presentó un tejido de reparación fenotípicamente de mayor similitud con el cartílago hialino adulto. En 9 casos la superficie fue lisa tipo hialina. En un caso se observó mala evolución con una superficie alterada (Fig. 7). Se pretende demostrar el tipo de superficie tipo hialina que se halló en este grupo.

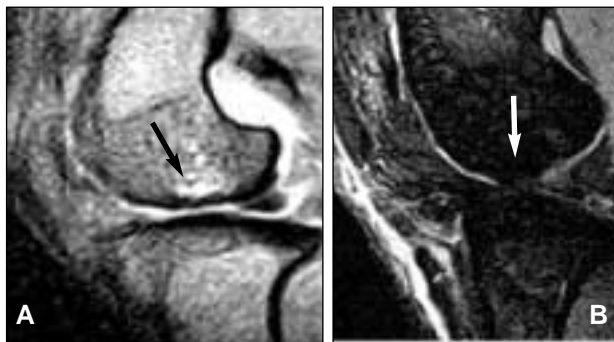
Histológicamente se pudo observar un neocartílago que rellenaba los defectos condrales. Se trataba de un tejido muy celular y más fibroso que el cartílago nativo. La parte más profunda del defecto fue ocupada por cartílago calcificado y hueso subcondral. En 4 casos no se pudo constatar desde el punto de vista histológico la integración del injerto con el cartílago adyacente (Fig. 8). En la tabla 6 se especifican los resultados macrohistológicos de los defectos tratados con células. Por inmunohistoquímica se confirmó la expresión del colágeno tipo II en las capas más profundas del tejido neocartilaginoso. Con mayor aumento se constató su expresión en la zona pericelular. Igualmente, su expresión no se correlacionó con lo que suele encontrarse en un tejido cartilaginoso hialino adulto nativo (Fig. 9). La diferencia entre el grupo estudio y el grupo control fue significativa ( $p < 0,005$ ).

**Diferencias entre el grupo con condrocitos y el grupo con células progenitoras**

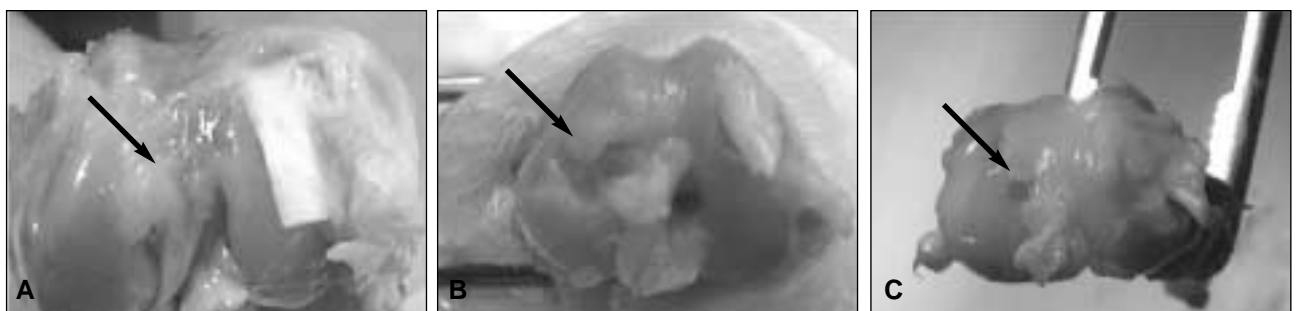
Se observaron diferencias histológicas en el neocartílago de regeneración entre ambas líneas celulares. Las células del grupo con células progenitoras fueron fenotípicamente diferentes de las del grupo con condrocitos, que eran más indiferenciadas. Asimismo, se observó la pre-



**Figura 2.** Defecto osteocondral relleno con un tejido con intensidad similar al tejido fibroso (flecha). Persistencia del edema.



**Figura 3.** RM de los defectos tratados con líneas celulares. Defecto osteocondral tratado con células. Se constata un estímulo regenerativo en la zona de lesión tratada con células. Existe cierta hipointensidad (flecha).



**Figura 4.** Defecto osteocondral sin tratamiento. Grupo control. A. Tejido fibroso de reparación (flecha). B y C. Alteración anatómica en la zona del defecto. Reabsorción y colapso en la zona del defecto (flecha).

**Tabla 2.** Resultados observados con la RM en el grupo control

N. control	Intensidad	Edema	Relleno	Final
1	4	4	1	4
2	4	4	1	4
3	4	3	1	4
4	3	3	1	3
5	3	3	2	3
6	4	4	1	4
7	3	3	2	3
8	4	4	1	4
9	4	4	1	4
10	4	4	1	4

**Tabla 3.** Resultados observados con la RM en el grupo estudio

Estudio	Intensidad	Edema	Relleno	Puntaje final
1	3	2	1	3
2	3	2	2	3
3	3	2	1	3
4	3	2	1	3
5	3	2	2	3
6	3	2	2	3
7	3	3	1	3
8	3	3	1	3
9	3	3	2	3
10	3	2	1	3

**Tabla 4.** Resultados observados por RM entre ambas líneas celulares

Estudio	Intensidad	Edema	Relleno	Puntaje final
Condrocitos	3	2	1	3
Condrocitos	3	2	1	3
Condrocitos	3	2	1	3
Condrocitos	3	2	1	3
Condrocitos	3	2	1	3
Células progenitoras	3	2	2	3
Células progenitoras	3	3	1	3
Células progenitoras	3	3	1	3
Células progenitoras	3	3	2	3
Células progenitoras	3	2	1	3

sencia de tejido calcificado y hueso subcondral que rellenaba un mayor porcentaje del defecto en el grupo con células progenitoras. Se constató también células en cúmulos en la zona del hueso subcondral compatible con una mayor actividad celular en esta zona (Figs. 10 y 11).

## Discusión

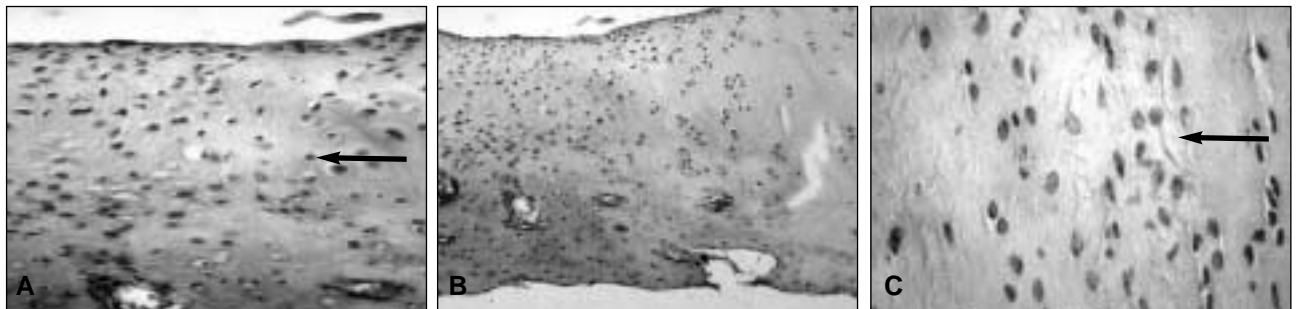
Los resultados observados en conejos adultos sugieren que ambas líneas celulares tienen capacidad regenerativa al ser inoculadas en las lesiones osteocondrales.

Los animales tratados con condrocitos autólogos a los 8 meses de implantación demostraron un estímulo regenerativo en las capas profundas, en las que se pudo constatar la expresión de colágeno tipo II. Sin embargo, las capas superficiales presentaron tejido fibrocartilaginoso. Considerando que el proceso regenerativo en el cartílago articular es lento, puede argumentarse la falta de tiempo de maduración en el injerto. Biopsias previas realizadas en pacientes tratados con injertos de condrocitos autólogos a los 6 meses de la operación no demuestran la regeneración en todo su espesor; sin embargo, a los dos años demuestran la presencia de un tejido cartilaginoso adulto totalmente regenerado.<sup>9,10</sup> No obstante, el porcentaje de regeneración varía según los autores. Briggs<sup>3</sup> determinó que sólo un 42% de los pacientes tratados presentaron una regeneración del cartílago articular, mientras que Brittberg<sup>4,11</sup> refiere esa regeneración en el 70% de los pacientes. Esto provoca cierta confusión en el momento de considerar el éxito de estas terapias. Por otro lado, se deben tener en cuenta los puntos débiles del procedimiento: no logra una distribución homogénea de las células en todo su defecto, ya que se encuentran en suspensión, con lo cual es probable que esto provoque su deposición en la zona más profunda del defecto y la mejor regeneración en esta zona. Asimismo, el cultivo en monocapa establece una desdiferenciación de las células alterando su metabolismo al ser inoculadas, lo cual disminuye probablemente su capacidad regenerativa.<sup>8</sup> Estos problemas tal vez se resuelvan en parte con la utilización de las matrices tridimensionales, que evita la desdiferenciación de las células y permite su distribución homogénea.

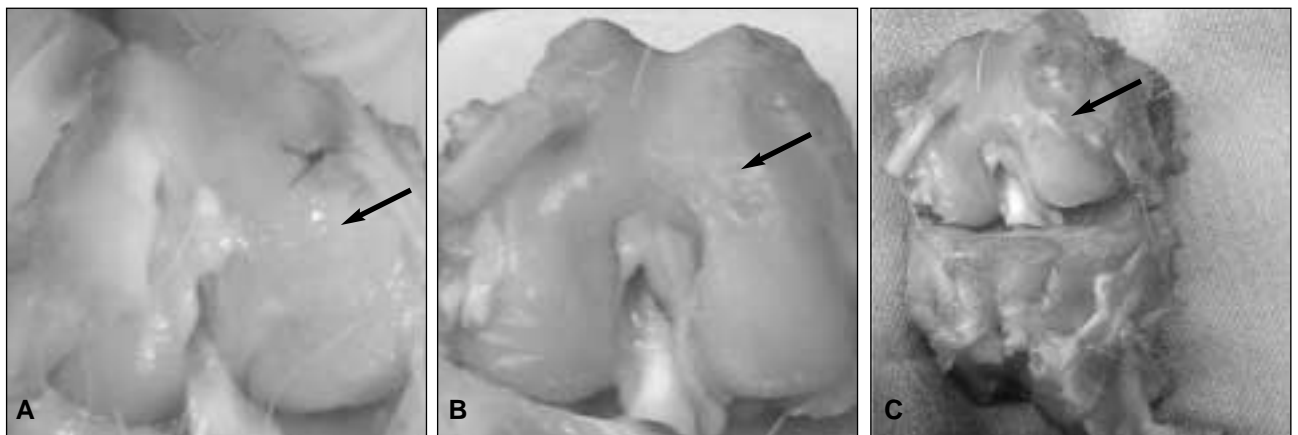
Nuestros resultados con la inoculación de células progenitoras demuestran una capacidad regenerativa similar con respecto a los condrocitos autólogos. Sin embargo, se pudieron constatar ciertas diferencias, principalmente en el fenotipo celular más indiferenciado y una mayor actividad en el hueso subcondral a través de la formación de células en cúmulos y una mayor producción de matriz extracelular. Esto coincide con otros investigadores que consideran que la pluripotencialidad de las células progenitoras determina un comportamiento diferente en cuanto a la biología regenerativa de éstas.<sup>1,16</sup> El gran flujo vascular y los factores de crecimiento presentes en la zona



**Figura 5.** Evaluación histológica de los defectos osteocondrales sin tratamiento. Grupo control. **A.** Obsérvese el defecto osteocondral. **B.** Otra pieza en donde se constata la superficie del cartílago con fibrilaciones (degenerado). **C.** Con mayor aumento se comprueba que el tejido fibroso rellena los defectos.



**Figura 6.** Evaluación con inmunohistoquímica para colágeno tipo II. Grupo control. Obsérvese la ausencia de colágeno tipo II en todas las capas del cartílago articular. Asimismo, se puede corroborar un fenotipo del tipo fibroso. No se observa la estructura en columnas típicas del cartílago hialino adulto.



**Figura 7.** Los defectos condrales tratados con líneas celulares presentan una superficie lisa con un aspecto de cartílago tipo hialino.



**Figura 8.** Histología de los defectos tratados con líneas celulares. **A.** En el neocartílago se observa un tejido con densidad celular mayor que la del cartílago hialino adulto. **B.** Falta de integración del injerto. **C.** Obsérvese la cantidad de cartílago calcificado en las zonas profundas.

**Tabla 5.** Resultados macrohistológicos de los defectos sin tratamiento

Células	Grado de reparación	Integración con el borde	Aspecto macroscópico	Puntaje total
Control	0	No evaluado	1	1
Control	0	No evaluado	0	0
Control	1	No evaluado	0	1
Control	0	No evaluado	0	0
Control	0	No evaluado	1	1
Control	1	No evaluado	0	1
Control	0	No evaluado	0	0
Control	0	No evaluado	0	0
Control	1	No evaluado	1	1
Control	1	No evaluado	0	1

**Tabla 6.** Resultados histológicos de los grupos tratados con líneas celulares

Grupo estudio	Grado de reparación	Integración con el borde	Aspecto macroscópico	Puntaje total
Condrocitos	3	3	4	2
Condrocitos	3	4	4	2
Condrocitos	3	2	4	2
Condrocitos	3	2	4	2
Condrocitos	3	3	4	2
Células progenitoras	3	4	4	2
Células progenitoras	3	2	4	2
Células progenitoras	3	2	2	3
Células progenitoras	3	3	4	2
Células progenitoras	3	3	4	2

profunda de los defectos osteocondrales establecerían la diferenciación hacia un tejido osteogénico con la formación de hueso lamelar y subcondral. En las zonas menos profundas, la falta de oxígeno y el fenómeno de compresión provocarían su diferenciación a tejido cartilaginoso.<sup>13</sup>

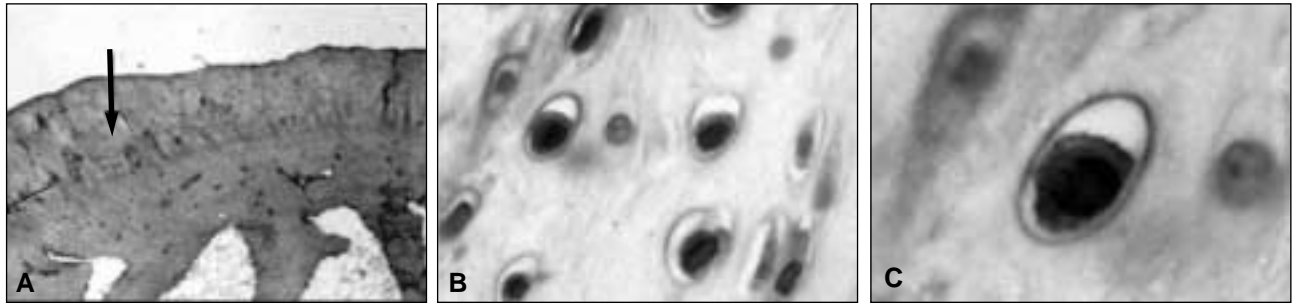
La resonancia magnética no pudo distinguir el tipo histológico en regeneración. La hipointensidad observada en los grupos tratados estaría relacionada con la alteración en la orientación en las fibras de colágeno y proteoglicanos de estos tejidos en proceso regenerativo determinada por la alta sensibilidad de la resonancia en el momento de evaluar pequeñas alteraciones en el cartílago articular. Esto coincide con investigaciones previas en las cuales se considera normal la hipointensidad de los injerto hasta el año del procedimiento.<sup>6,12</sup>

En conclusión, estas terapias celulares generan un estímulo regenerativo en las lesiones osteocondrales. Sin embargo, consideramos la necesidad de comenzar a incorpo-

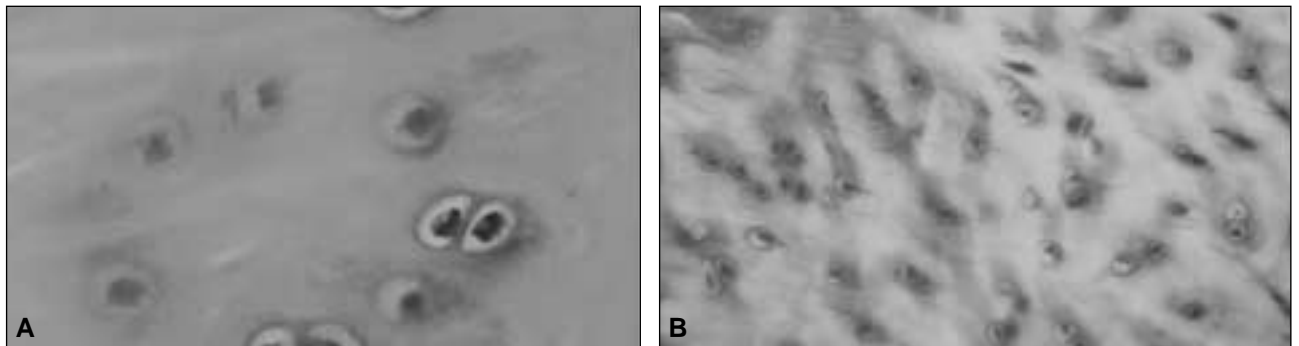
rar matrices tridimensionales que permitan una distribución homogénea de las células dentro de la lesión, disminuir la morbilidad del procedimiento y evitar el proceso de desdiferenciación que estas células sufren durante el cultivo en monocapa. La utilización de factores del crecimiento específicos sintéticos (osteogénicos y condrogénicos) permite guiar mejor estas células en un proceso tan complejo de regeneración.<sup>1,13</sup>

### Conclusiones

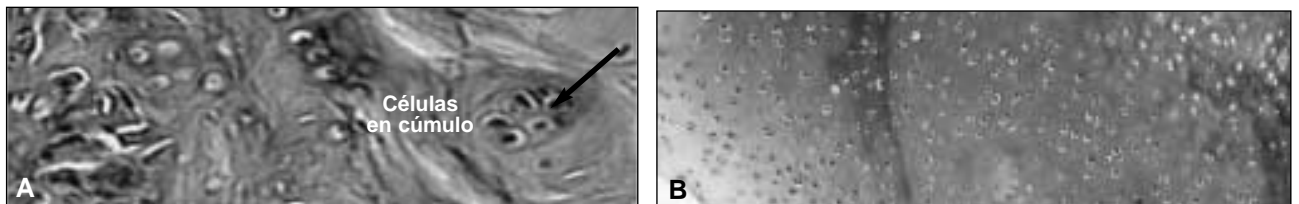
La utilización de las terapias celulares en las lesiones del cartílago articular abre una nueva opción terapéutica biológica y regenerativa. Si bien nuestro ensayo ha demostrado un estímulo regenerativo, creemos necesario seguir mejorando los procedimientos con matrices y factores de crecimiento sintéticos que permitan mejorar ese estímulo.



**Figura 9.** Inmunohistoquímica para colágeno tipo II de los defectos condrales tratados con líneas celulares. **A.** Expresión del colágeno tipo II en las capas más profundas del tejido neocartilaginoso. **B y C.** Expresión pericelular del colágeno tipo II.



**Figura 10.** Diferencias histológicas entre condrocitos y células progenitoras. **A.** Obsérvese el fenotipo adulto condrocitario con el típico halo blanco que rodea a las células (condrocitos). **B.** Células progenitoras con un fenotipo indiferenciado.



**Figura 11.** Comportamiento en el hueso subcondral y cartílago calcificado en los defectos osteocondrales tratados con células progenitoras. **A.** Se observa la presencia de células en cúmulo y una mayor cantidad de cartílago calcificado en relación con todo el espesor del cartílago hialino. **B.** Cartílago calcificado y con mayor densidad de células comparado con cartílago hialino adulto nativo.

Una adecuada selección de la línea celular, la matriz tridimensional y el estímulo biológico continúa siendo un desafío dentro de la ingeniería de tejidos. El éxito terapéutico en la regeneración del cartílago articular dependerá de los avances futuros en el entendimiento de la biología del cartílago articular y de las células progenitoras, y del desarrollo tecnológico de la ingeniería.

### Agradecimientos

Al equipo de Ciencias Básicas y Medicina Experimental, por su apoyo y enseñanza constante en el área de la ingeniería de los tejidos.

A la Fundación Ottolenghi y a la AAOT, por la subvención recibida para el desarrollo del proyecto.



## Referencias bibliográficas

1. **Baksh D, Song L, Tuan RS.** Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation and application in cell and gene therapy. *J Cell Mol Med*;8(3):301-316;2004.
2. **Bentley G, Biant LC, Carrington RW, et al.** A prospective, randomised comparison of autologous chondrocyte implantation versus mosaicplasty for osteochondral defects in the knee. *J Bone Joint Surg Br*;85(2):223-230;2003.
3. **Briggs TW, Mahroof S, David LA, et al.** Histological evaluation of chondral defects after autologous chondrocyte implantation of the knee. *J Bone Joint Surg Br*;85(7):1077-1083;2003.
4. **Brittberg M, Tallheden T, Sjogren-Jansson B, et al.** Autologous chondrocytes used for articular cartilage repair: an update. *Clin Orthop*;(391 Suppl):S337-S348;2001.
5. **Buckwalter JA.** Articular cartilage injuries. *Clin Orthop*;(402):21-37;2002.
6. **Burstein D, Velyvis J, Scott KT, et al.** Protocol issues for delayed GD (DTPA) 2 enhanced MRI (d-GEMRIC) for clinical evaluation of articular cartilage. *Magn Reson Med*;45(1):36-41;2001;
7. **Caplan AI.** Review: mesenchymal stem cells: cell-based reconstructive therapy in orthopedics. *Tissue Eng*;11(7-8):1198-1211; 2005.
8. **Finger F, Schorle C, Soder S, et al.** Phenotypic characterization of human chondrocyte cell line C-20/A4: a comparison between monolayer and alginate suspension culture. *Cells Tissues Organs*;178(2):65-77;2004.
9. **Horas U, Pelinkovic D, Herr G, et al.** Autologous chondrocyte implantation and osteochondral cylinder transplantation in cartilage repair of the knee joint. A prospective, comparative trial. *J Bone Joint Surg Am*;85-A(2):185-192;2003.
10. **Minas T.** Autologous chondrocyte implantation for focal chondral defects of the knee. *Clin Orthop*;(391 Suppl):S349-S361; 2001.
11. **Peterson L, Minas T, Brittberg M, et al.** Two- to 9-year outcome after autologous chondrocyte transplantation of the knee. *Clin Orthop*;(374):212-234;2000.
12. **Recht M, Bobic V, Burstein D, et al.** Magnetic resonance imaging of articular cartilage. *Clin Orthop*;(391 Suppl):S379-S396; 2001.
13. **Rodeo SA, Hidaka C, Maher SA.** What's new in orthopaedic research? *J Bone Joint Surg Am*;87(10):2356-2365;2005.
14. **Smith GD, Knutsen G, Richardson JB.** A clinical review of cartilage repair techniques. *J Bone Joint Surg Br*;87(4):445-449; 2005.
15. **Tins B, McCall IW, Takahashi T, et al.** Autologous chondrocyte implantation in the knee joint. MR Imaging and histologic. Features at 1- year follow-up. *Radiology*;234(2):501-508;2005.
16. **Wakitani S, Tatsuhiko G, Pineda S, et al.** Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am*;76(4):579-592;1994.