

**APLICACIONES TERAPEÚTICAS DE LAS CELULAS MADRE PARA LA
REGENERACIÓN DE CARTILAGO HIALINO HUMANO**

Laura Valentina Ávila Rondón

DIRECTOR

Viviana Marcela Rodríguez Pardo MSc. PhD

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA



FACULTAD DE CIENCIAS

CARRERA DE BACTERIOLOGÍA

BOGOTA, D.C. NOVIEMBRE DE 2019

**APLICACIONES TERAPEÚTICAS DE LAS CELULAS MADRE PARA LA
REGENERACIÓN DE CARTILAGO HIALINO HUMANO**

Laura Valentina Ávila Rondón

**TRABAJO DE GRADO PRESENTADO COMO REQUISITO PARCIAL PARA OPTAR
EL TITULO DE BACTERIOLOGA**

DIRECTOR

Viviana Marcela Rodríguez Pardo MSc. PhD

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA



FACULTAD DE CIENCIAS

CARRERA DE BACTERIOLOGÍA

BOGOTA, D.C. NOVIEMBRE DE 2019

**APLICACIONES TERAPEÚTICAS DE LAS CELULAS MADRE PARA LA
REGENERACIÓN DE CARTILAGO HIALINO HUMANO**



LAURA VALENTINA ÁVILA RONDÓN

APROBADO

Viviana Marcela Rodríguez Pardo MSc. PhD

Directora

Hugo Diez Ortega

Jurado

NOTA DE ADVERTENCIA

Artículo 23 de la Resolución N° 13 de Julio de 1946.

“La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará por qué no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y porque las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”

AGRADECIMIENTOS

A la Dr. Viviana Rodriguez por su dedicación y guía en cada uno de los pasos de este proceso, por brindarme enseñanzas y conocimientos, sin ella no hubiera sido posible la realización de este trabajo.

Al Departamento de Ortopedia y Traumatología del Hospital Universitario San Ignacio.

Y a mi familia por todo su apoyo incondicional.

TABLA DE CONTENIDO

Resumen.....	10
1. Introducción.....	12
2. Justificación y planteamiento del problema.....	13
3. Objetivo general.....	14
3.1. Objetivos específicos.....	14
4. Metodología.....	15
5. Marco conceptual.....	16
5.1. Proceso de condrogénesis durante la etapa embrionaria y fetal.....	16
5.2. Patologías asociadas con degeneración de cartílago hialino articular.....	30
5.3. Enfermedades osteoarticulares en Colombia.....	33
5.4. Opciones terapéuticas para la degeneración de cartílago hialino humano.....	34
5.5. Antecedentes en el uso de la terapia celular con células madre para tratamiento de lesiones en el cartílago hialino humano.....	35
5.5.1. Aislamiento y caracterización de células madre mesenquimales.....	40
5.5.2. Aislamiento y caracterización de células madre embrionarias.....	43
5.5.3. Aislamiento y caracterización de células madre pluripotentes inducidas.....	44
5.5.4. Aislamiento y caracterización de células madre esqueléticas humanas.....	46
5.6. Avances de la biotecnología en el uso de células madre para medicina regenerativa.....	47
5.6.1.Cultivo celular 3D.....	48
5.6.2.Organoides.....	50
5.6.3.Bioimpresión.....	50
6. Discusión.....	53
7. Perspectivas.....	55
8. Conclusiones.....	55
9. Bibliografía.....	56

Lista de Abreviaturas

CMM	Células madre mesenquimales
CMN	Células Mononucleares
iPSC	Induced Pluripotent Stem Cells
MO	Médula ósea
ISCT	International Society for Cellular Therapy
FGF	Fibroblast Growth Factor -Factor de Crecimiento de Fibroblastos
BMP	Bone Morphogenetic Protein
POMC	Proteína Oligomérica de la Matriz del Cartílago
UCMA	Unique cartilage matrix-associated protein
OCD	Osteocondritis Disecante
CME	Células Madre Embrionarias
TGFβ	Transforming Growth Factor beta
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinases
CMH	Células Madre Hematopoyéticas
MEF	Mouse Embryonic Fibroblasts
SSEA	Stage Specific Embryonic Antigens
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's
PDPN	Podoplanin

Lista de figuras

Figura 1	Estructura del mesodermo	19
Figura 2	Proceso de condrogénesis	20
Figura 3	Vía de señalización osificación endocondral	23
Figura 4	Zonas de los diferentes estadios de diferenciación de los condrocitos	25
Figura 5	Vía de señalización de BMP's	27
Figura 6	Morfología del cartílago hialino articular	28
Figura 7	Efectos de la hipoxia en la condrogénesis	29
Figura 8	Patologías asociadas a la alteración del cartílago hialino articular	30
Figura 9	Tipos de cultivos celulares.....	49
Figura 10	Bioimpresión	52

Lista de tablas

Tabla1	Términos empleados en la búsqueda de literatura	15
Tabla 2	Comparación entre los diferentes tipos de cartílago	17

Resumen

Con el descubrimiento de las células madre, a lo largo de los años se ha profundizado en su fisiología para demostrar que estas células tienen el potencial de autorrenovación y diferenciación a diversos linajes celulares. Actualmente se clasifican de acuerdo a su origen en células madre embrionarias (CME), células madre pluripotentes inducidas (iPSC) y células madre derivadas de tejidos adultos. Estas células son empleadas como terapia en enfermedades osteoarticulares que afectan principalmente a la población de edad avanzada, cuyo tratamiento mejora parcialmente los signos y síntomas pero no regeneran por completo la articulación, por esta razón las células madre representan una opción terapéutica prometedora para tratar este tipo de enfermedades. Para la realización de esta monografía se realizó una búsqueda de literatura en la base de datos Pubmed a partir de diferentes criterios demostrando que durante la etapa embrionaria y fetal, se da origen al cartílago a partir de la osificación endocondral, la cual se divide en la condensación de células mesenquimales (CMM), la diferenciación de condrocitos y por último la hipertrofia. Estos procesos están mediados por vías de señalización que inducen la expresión de genes que codifican para componentes esenciales del cartílago como TGF β , que activa sox9 un factor de transcripción implicado en la producción de colágeno tipo II y agrecano, por otro lado la proteína morfogenética ósea (Bone Morphogenetic Protein- BMP) e Indian Hedgehog(Ihh) activan RUNX2, un factor de transcripción implicado en la producción de colágeno tipo X y metaloproteinasa13 en condrocitos hipertróficos que formarán hueso. El cartílago hialino articular se ubica en las articulaciones, y puede sufrir alteraciones como consecuencia de enfermedades degenerativas (ejemplo la osteoartritis) o asociadas a trauma que afectan la movilidad en la articulación, estas son tratadas a partir de condroplastía, microfractura y trasplante autólogo de

condrocitos, sin embargo, estos no tienen efectividad a largo plazo, solo mejoran signos y síntomas sin regenerar el tejido lesionado. Para regenerar tejidos lesionados como el cartílago la terapia celular es una opción terapéutica adicional a los tratamientos convencionales, en esta técnica se emplean células madre para ser transplantadas al paciente con el objetivo de que mejoren la integridad del tejido; dentro de las células que se han empleado están las CMM, CME, células madre pluripotentes inducidas (Induced pluripotent stem cells- iPSC) y recientemente se ha descrito una nueva población que se considera una célula madre denominada célula madre esquelética humana (Human skeletal stem cell- hSSC). Se ha demostrado a partir de ensayos experimentales que el uso de la terapia celular mejora la integridad del tejido cartilaginoso, por lo tanto, se han desarrollado organoides compuestos de células madre cuyo objetivo es igualmente regenerar el cartílago al ser implantados en los pacientes. Por último la evidencia del uso de la terapia celular, muestra que es efectiva para mejorar la estructura e integridad del tejido cartilaginoso, así como en la mejora de la movilidad de la articulación, lo que representa una opción terapéutica de importancia para pacientes que padecen enfermedades osteoarticulares, mejorando su calidad de vida.

1. Introducción.

Con el descubrimiento de las células madre, a lo largo de los años se ha profundizado en su fisiología demostrando que estas células tienen la capacidad de autorrenovación y diferenciación a diversos linajes celulares; Esto les confiere la capacidad no solo de dar origen sino de restaurar sus funciones en los tejidos. Actualmente se clasifican en tres tipos: células madre embrionarias (CME) derivadas de embriones en estadios tempranos de desarrollo, células madre pluripotentes inducidas (iPSC) y células madre adultas que incluye células madre hematopoyéticas (CMH), células madre neuronales y células madre mesenquimales, entre otras. Estas células son empleadas en medicina regenerativa como terapia para diversas enfermedades, como las enfermedades degenerativas articulares. Las enfermedades articulares afectan principalmente a pacientes de edad avanzada, como opción terapéutica existen diferentes técnicas que mejoran parcialmente los signos y síntomas de la enfermedad pero no regeneran por completo el tejido articular, por esta razón las células madre representan una opción terapéutica prometedora para tratar este tipo de enfermedades.

2. Justificación y planteamiento del problema.

Desde finales de la década de los años 60 América Latina ha sufrido cambios demográficos en la pirámide poblacional; como el envejecimiento progresivo de la población. Según estimaciones de las Naciones Unidas realizadas en el año 2017, se esperaba que la población mayor de 60 años creciera del 11% al 25% en los próximos 35 años, esto se debe principalmente al descenso de la fecundidad y natalidad y al aumento en la esperanza de vida (1).

Este fenómeno impacta en Colombia, donde la tasa de fecundidad ha venido disminuyendo desde el año 2005 con una tasa del 2,30% a una tasa del 1,83% en el año 2015, se espera que esta tasa se mantenga hasta el 2020 (1). Por otro lado, hoy en día la población mayor de 60 años es del 14% aproximadamente (2), y se espera que para el 2050 corresponda entre el 23 al 27,6% del total de la población (3, 4). Todo esto trae consigo un aumento en las enfermedades crónicas, siendo estos procesos patológicos de evolución prolongada, los cuales no pueden ser tratados completamente. Dentro de estas enfermedades se destaca el impacto de las enfermedades musculoesqueléticas, ya que a pesar de tener una tasa de mortalidad baja, tienen un gran efecto en la calidad de vida de las personas (3); ejemplo de ello son las patologías que causan la degeneración del cartílago provocando rigidez, dolor en las articulaciones, y pérdida en la funcionalidad de la articulación, lo que genera altas tasas de morbilidad en la población mayor, una alta carga económica al sistema de salud y problemas asociados a discapacidad (5), para las lesiones del cartílago no existe un tratamiento definitivo y a largo plazo, actualmente se realizan tres procedimientos: la condroplastía, la microfractura y trasplante autólogo de condrocitos, los cuales alivian el dolor y la inflamación en la articulación, pero no restauran en su totalidad la

estructura cartilaginosa y su funcionalidad, por esta razón la terapia celular con células madre ha mostrado ser una opción terapéutica para tratar enfermedades que producen la degeneración del cartílago, lo cual mejoraría la condición de vida de las personas que las padecen (6).

Con base en esto la pregunta que se plantea es ¿Qué evidencia existe en literatura científica sobre el uso terapéutico de células madre para regeneración de cartílago hialino articular en humanos?

3. Objetivo general.

Revisar literatura científica relacionada con las aplicaciones terapéuticas de diferentes tipos de células madre para la regeneración de cartílago hialino humano.

3.1. Objetivos específicos.

3.1.1. Revisar los procesos de condrogénesis humana durante la etapa embrionaria y fetal.

3.1.2. Explorar la fisiopatología de las enfermedades más frecuentes asociadas con trauma o degeneración de cartílago hialino humano.

3.1.3. Indagar en el papel de las células madre como terapia celular para regenerar cartílago hialino humano.

3.1.4. Verificar avances de la biotecnología en el uso de células madre para medicina regenerativa.

4. Metodología.

Para la realización de esta monografía se realizó una búsqueda en Pubmed, de literatura publicada desde el año 1994 hasta el 2019 (con excepción de tres publicaciones realizadas en 1968 y 1991) bajo los criterios de búsqueda descritos en la tabla 1. En total se revisaron 109 citas bibliográficas.

Tabla 1. Términos empleados en la búsqueda de literatura

Tema	Términos
Proceso de condrogénesis durante la etapa embrionaria y fetal	“Chondrogenesis” “Embryogenesis” “Chondrogenesis signaling pathways”
Patologías asociadas con degeneración de cartílago hialino articular	“Articular cartilage” “Cartilage disease” “Osteoarthritis” “Osteogenesis imperfecta” “Achondroplasia”
Enfermedades osteoarticulares en Colombia	“Osteoarthritis in Colombia”
Opciones terapéuticas para la degeneración de cartílago hialino humano	“Cartilage treatment” “Articular cartilage repair”
Antecedentes en el uso de la terapia celular para tratamiento de lesiones en el cartílago hialino humano	“Cellular based therapy” “Stem cell therapy” “Cellular therapy review” “Mesenchymal stem cell in cartilage” “Embryonic stem cell for cartilage repair” “induced pluripotent stem cells +cartilage” “Cellular therapy for cartilage”
Aislamiento y caracterización de células madre mesenquimales	“Mesenchymal stem cell isolation” “Mesenchymal stem cell cultures” “Mesenchymal stem cell characterization”

Tema	Términos
Aislamiento y caracterización de células madre embrionarias	“Embryonic stem cell isolation” “Embryonic stem cell characterization”
Aislamiento y caracterización de células madre pluripotentes inducidas	“Induced pluripotent stem cell isolation” “Induced pluripotent stem cell” “Induced pluripotent stem cell isolation”
Aislamiento y caracterización de células madre esqueléticas humanas	“Human Skeletal Stem Cell”
Futuras terapias en medicina regenerativa con el uso de células madre	“Future perspectives of stem cell therapy” “Bioprinting” “3D bioprinting and regenerative medicine”

5. Marco conceptual.

5.1. Proceso de condrogénesis durante la etapa embrionaria y fetal.

El cartílago es un tejido conjuntivo especializado compuesto por una matriz extracelular y células denominadas condrocitos. Es avascular y sin terminaciones nerviosas, que se clasifica en cartílago elástico, fibrocartílago y el cartílago hialino (Tabla 2) (7). El cartílago hialino es el más abundante en los tejidos, posee una matriz compuesta por colágeno tipo II, agregano, proteoglucanos (ácido hialurónico, el condroitín sulfato y el queratán sulfato) y condronectina. Esta estructura se nutre a partir del pericondrio, sin embargo, el cartílago hialino articular carece de este, por esta razón el líquido sinovial es aquel que proporciona la nutrición de la matriz y favorece su lubricación (8).

Tabla 2. Comparación entre los diferentes tipos de cartílago.

	CARTILAGO HALINO	CARTILAGO ELÁSTICO	FIBROCARTILAGO
Células	Condrocitos o condroblastos	Condrocitos o condroblastos	Condrocitos o condroblastos
Composición	Matriz extracelular con fibras de colágeno, y agregano	Matriz extracelular con fibras de colágeno y red densa de fibras elásticas	Tejido conectivo denso, fibras de colágeno tipo I y cartílago hialino
Tipo de colágeno	Tipo II	Tipo II	Tipo I y Tipo II
Localización	Costillas, laringe, anillos cartilagosos que sostienen la tráquea, placas de cartílago irregulares en las paredes de los bronquios, superficie articular de los huesos.	Oído externo, los canales auditivos externos y los tubos auditivos, epiglotis, cartílagos corniculados y cuneiformes de la laringe.	Anillo fibroso de los discos intervertebrales, la sínfisis del pubis y algunas uniones hueso-ligamento

Durante la etapa embrionaria, después de la fecundación, el embrión sufre tres clivajes para formar la mórula, compuesta de trofoblastos, que da origen al blastocisto, el cual se implanta en la pared uterina. Posteriormente una parte de la masa interna de células forma el epiblasto (9), y a partir de esta estructura se forman tres nuevas capas celulares, las células del epiblasto sufren una invaginación lo que da origen al endodermo y al mesodermo, dejando una población de células que no migra hacia el interior para formar el ectodermo (10).

En el mesodermo, se encuentra una zona denominada mesodermo paraxial entre el tubo neural y el mesodermo intermedio, esta zona se divide formando diferentes somites, uno de los cuales se compone de células mediales ventrales cercanas al tubo neural, las cuales sufren mitosis, pierden sus características epiteliales y forman células madre mesenquimales (CMM) (Figura 1) (9). A partir del mesénquima ocurre la osificación intramembranosa, en la cual las CMM se diferencian directamente en osteoblastos para formar el hueso y la osificación endocondral en la que se dan tres etapas consecutivas las cuales dan origen al cartílago y hueso. Estas etapas se dividen en: condensación de CMM, diferenciación hacia condrocito, e hipertrofia para la formación de hueso (11). (Figura 2).

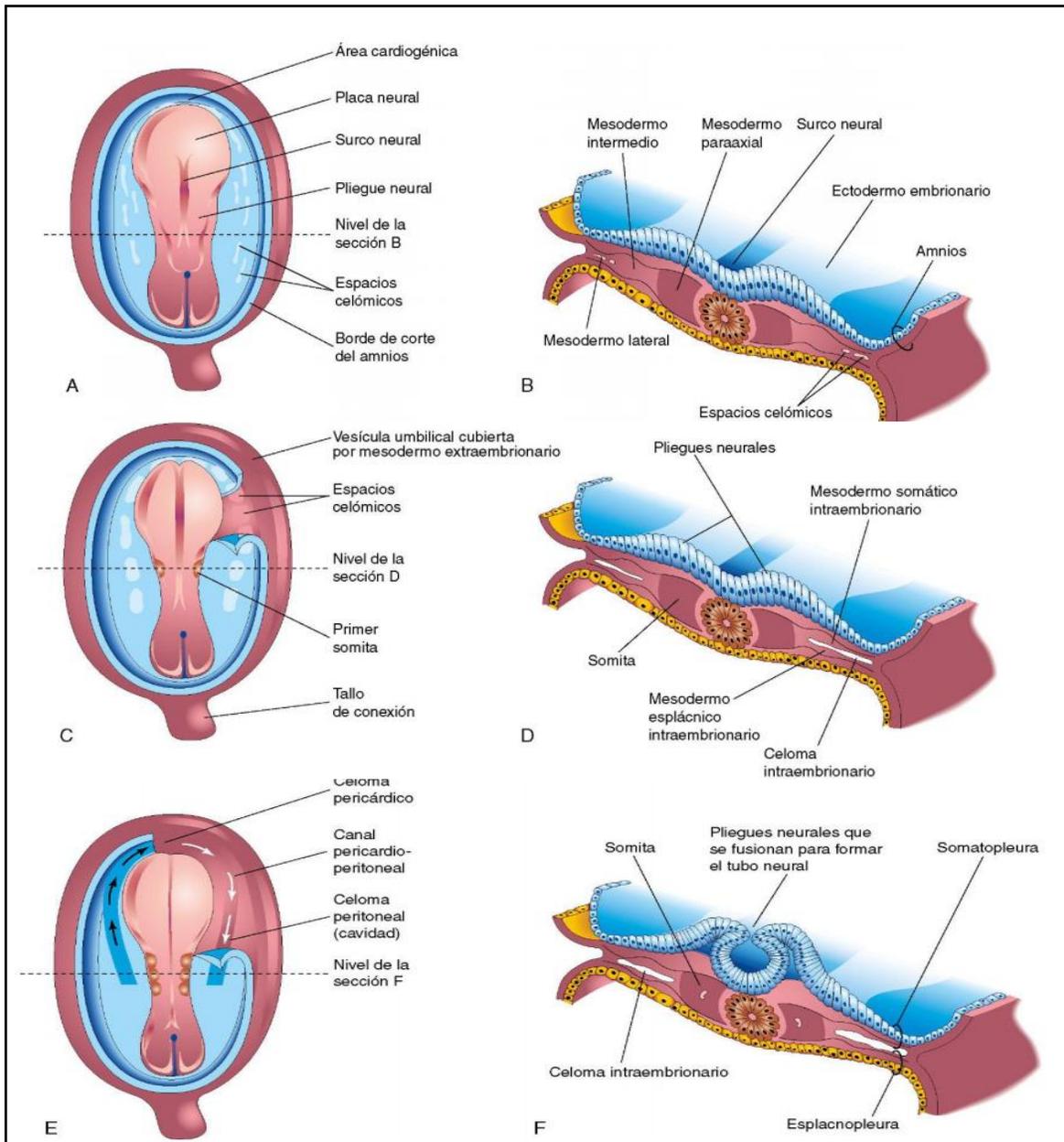


Figura 1. Estructura del mesodermo. (A, B) La zona del mesodermo intermedio que se ubica a cada lado del tubo neural se transforma en el mesodermo paraaxial. (C,D,E,F) Al final de la tercera semana se diferencia y se divide en somites, que son de forma cuboidal y dan lugar al esqueleto y los músculos asociados (12).

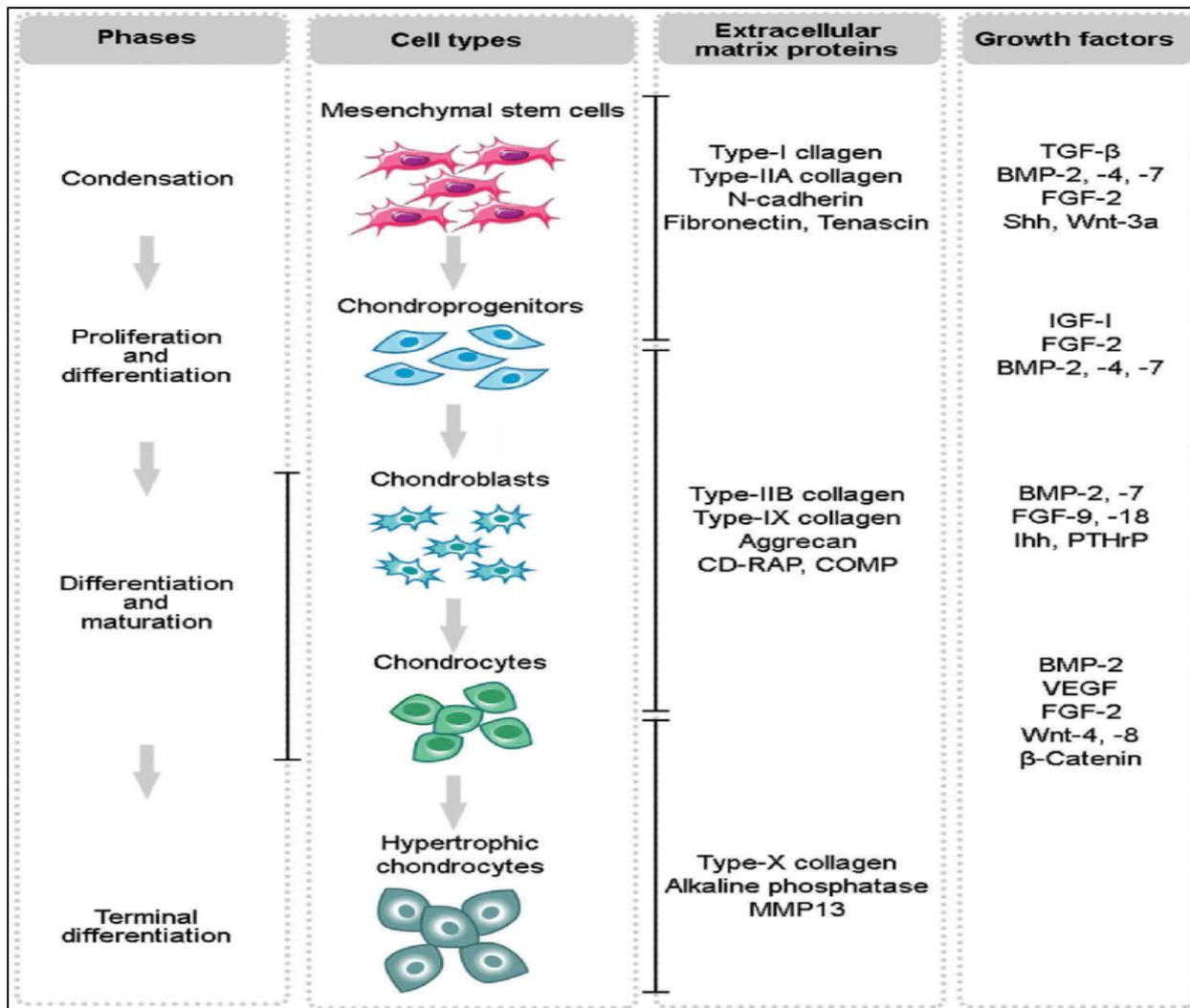


Figura 2. Proceso de condrogénesis. En la figura se puede observar el principio de la diferenciación condrogénica de células madre mesenquimales. En cada etapa se destacan los factores de crecimiento implicados como el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), la proteína morfogenética ósea tipo 2, 4 y 7 (Bone Morphogenetic Protein BMP), el factor de crecimiento transformante beta (TGF β), Sonic hedgehog (shh), y Wnt, entre otros, además del producto de estos factores como el Colágeno tipo II y aggrecano (13).

Durante la etapa de condensación, las CMM no diferenciadas de la placa lateral del mesodermo migran a la región donde se desarrollarán las extremidades superiores e inferiores, para agregarse (14) y adherirse con células adyacentes a través de la expresión de moléculas de adhesión como N-cadherina dependiente de calcio junto con β -catenina, y la molécula de adhesión

de células neurales (N-CAM) independiente de calcio (15). El tipo 1 y 3 del factor de crecimiento transformante beta (TGF β), estimula la síntesis de estas moléculas de adhesión, y de proteínas como la fibronectina y la tenascina, además la señalización Wingless-Int (Wnt) participa en la modulación de la expresión de N-cadherina mediada por TGF- β en CMM (14).

Durante el desarrollo fetal continua la etapa de diferenciación, la cual se inicia con la regulación negativa de la expresión de N-cadherina por las proteínas quinasa activada por mitógenos (MAPK), que bloquean la translocación en el núcleo de β -catenina mediada por Wnt, la reducción de la expresión de N-cadherina es un paso que se requiere para terminar la condensación y continuar con la diferenciación. (16) Otro paso crucial es la unión de TGF- β a sus receptores específicos de serina/treonina quinasa tipo II para activar el correspondiente receptor de tipo I y así desencadenar vías de señalización canónicas dependientes de la fosforilación de Smad o vías no canónicas (17).

TGF β se une al complejo de receptores compuesto por uno de tipo I (T β RI/ALK5) y dos receptores de quinasa tipo II (T β RII), al unirse al tipo II se recluta el tipo I para posteriormente fosforilar el receptor activado Smad2 y 3, que interactúan con Smad4, formando un complejo (Smad 2/3/4) que se transloca al núcleo, para reclutar cofactores que regulan la expresión génica, también se puede dar la activación de Smad1, 5, y 8, a través de la unión a ALK1. Existen vías alternativas independientes de Smad, en las que se da la activación de la quinasa 1(TAK1) y la proteína de unión a TAK1 (TAB1) que a su vez inicia la cascada de señalización de p38 MAPK o – la quinasa de regulación extracelular (Erk, por sus siglas en inglés) (18). Finalmente en el núcleo,

el complejo Smad 2/3/4 se une directamente a la secuencia de ADN GTCTAGAC, esta unión está regulada por SRY-box9 (sex determining region-SOX9) (19), un factor de transcripción fundamental en la condrogénesis, que asegura la diferenciación hacia linaje condrocito, promueve la supervivencia de condrocitos e induce la expresión de factores de crecimiento (20). Sox 9 permite la expresión de genes que codifican para los componentes esenciales de la matriz extracelular del cartílago, como colágeno tipo II, agregano, y los reguladores de estos componentes como la condroitina (20), por otro lado TAK 1, induce la unión del factor de transcripción activado 2 (ATF2), via p38 MAPK, que a su vez promueve la activación de Sox 9 (19). La señalización a través de Smad2/3 bloquea la última etapa de diferenciación de condrocitos, lo cual es esencial en la formación de cartílago hialino articular (Figura 3) (21).

Por otro lado, las matrilinas son proteínas de la matriz extracelular que median las interacciones entre las fibras de colágeno y otros componentes de la matriz. Existen 4 tipos de matrilinas expresados en el cartílago, la 1, 3 y 4 las cuales son abundantes en el cartílago epifisario y en la placa de crecimiento, mientras que la 2 se encuentra solo en la capa más externa de la superficie de la articulación, la matrilina-1 se une al agregano y se asocia con fibras de colágeno tipo II, además se une a la proteína oligomérica de la matriz del cartílago (POMC) (24).

Posteriormente, los condrocitos inmaduros expresan las proteínas estructurales colágeno tipo II y agregano (25). Adicionalmente, en esta etapa los condrocitos se encuentran en tres diferentes estados de diferenciación: los de baja proliferación presentes en la zona de reposo, los de alta proliferación presentes en la zona distal, y los de la zona hipertrófica (Figura 4), según el estado en que se encuentren expresan diferentes genes. Los condrocitos de alta proliferación expresan el receptor del factor de crecimiento de fibroblastos 3 (FGF, por sus siglas en inglés Fibroblast growth factor), los hipertróficos expresan Indian hedgehog (Ihh), colágeno tipo x, y metaloproteinasa 13 (MMP13), sin embargo, se sabe poco de los genes expresados por los condrocitos de la zona de reposo. A partir de un modelo murino, se identificó la proteína asociada a la matriz del cartílago (UCMA), encontrada abundantemente en la zona inmadura del cartílago epifisario fetal y juvenil (12), en ensayos con ratones esta proteína se expresaba bajo el estímulo de ácido retinoico (26, 27). In vitro, se pudo observar que la expresión de marcadores osteogénicos en células que habían sido inducidas a diferenciarse en osteoblastos fue inhibida por UCMA, por tal razón se cree que esta proteína puede ser un factor paracrino que regula la diferenciación osteogénica y condrocítica (28).

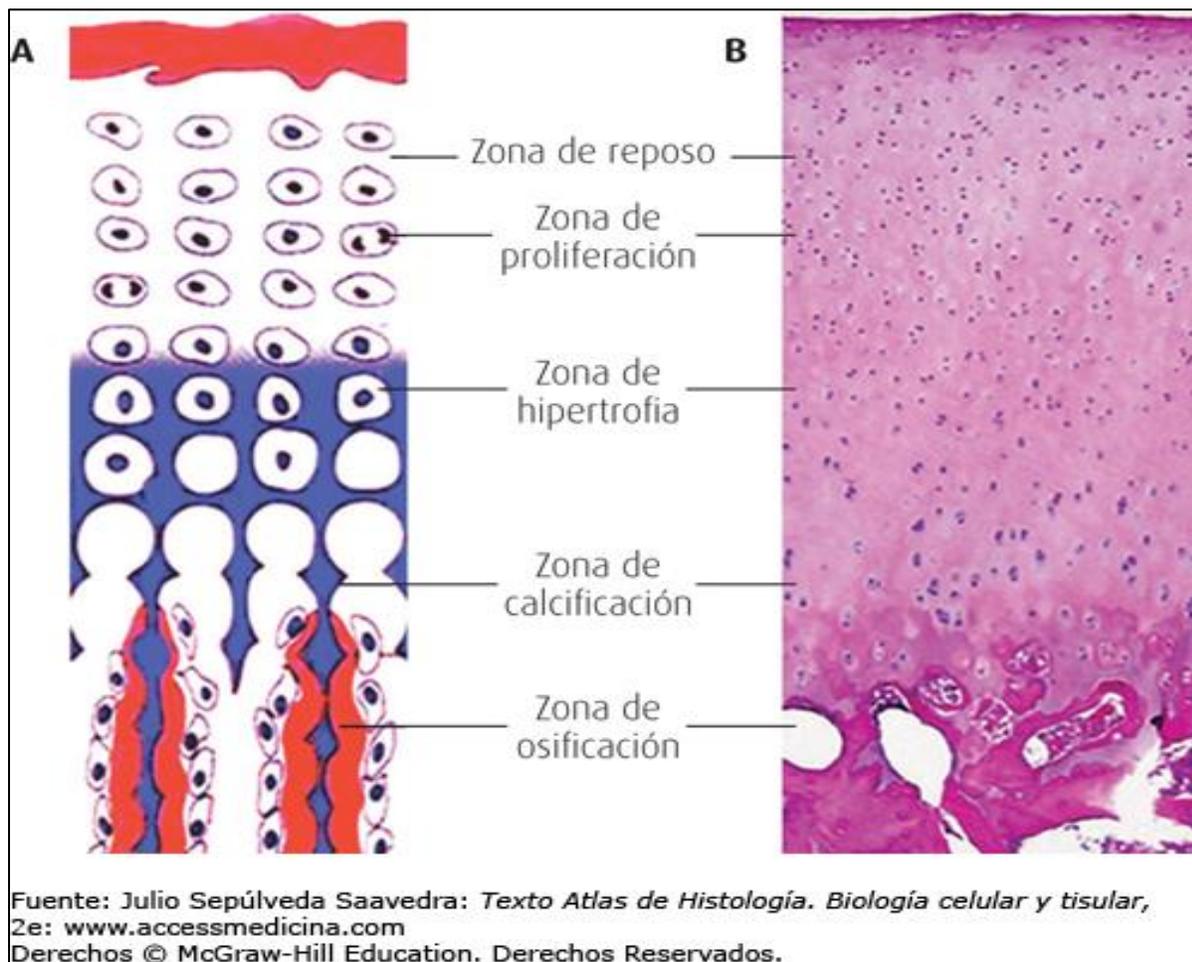


Figura 4. Zonas de los diferentes estadios de diferenciación de los condrocitos. Durante la etapa de diferenciación los condrocitos se encuentran en diferentes estadios, según la zona en la que se encuentren dentro del cartílago ubicado en las placas epifisarias de crecimiento. (A) Representación gráfica de las zonas donde se encuentran los condrocitos: los de baja proliferación presentes en la zona de reposo, los de alta proliferación presentes en la zona distal, y los de la zona hipertrófica. (A) Representación gráfica de las zonas de proliferación (B) Corte histológico de la placa epifisaria de crecimiento (29).

La siguiente etapa es la maduración de condrocitos a un estado hipertrófico, la cual no está regulada por una sola ruta, sino por múltiples vías de señalización (Figura 4). La primera vía es activada por la proteína morfogenética ósea (Bone Morphogenetic Protein-BMP) (que hace parte de la superfamilia de las proteínas TGF β), que se une a sus receptores induciendo la fosforilación

de Smad1, 5, y 8, los cuales forman un complejo con Smad 4, que se trasloca al núcleo(30), uniéndose a la secuencia GCCGnCGC del ADN para estimular al factor de transcripción RUNX2, que regula la expresión de los genes que codifican para la metaloproteínasa de matriz 13 (MMP13) y para colágeno tipo X (COL10A1) (Figura 5).

Otra vía de señalización es la de Ihh, una proteína perteneciente a la familia de proteínas Hedgehog (Hh), la cual se produce principalmente por los condrocitos prehipertróficos. Patched1 (Ptch1) y Smoothened (Smo), son dos receptores transmembrana que hacen parte de esta vía de señalización, sin embargo, en ausencia de Ihh, Ptch1 inhibe Smo suprimiendo los factores de transcripción Gli1, 2 y 3. Cuando Ihh es producido por la célula, se une a Ptch1, deteniendo la inhibición de Smo, para permitir que los factores de transcripción Gli se activen e ingresen al núcleo, induciendo la expresión de Runx2 (31).

La señalización por el FGF 2 induce la expresión de RUNX2, por medio de la unión de FGF2 a FGFR1, lo cual activa Ras y la proteína quinasa C delta (PKC δ), que transfieren las señales al núcleo regulando positivamente la expresión de RUNX2 por la cascada Raf-MEK1/ 2-ERK1/2. (32).

Finalmente, gracias a ello se generan condrocitos hipertróficos que expresan colágeno tipo X, el factor de crecimiento vascular endotelial A (VEGFA), MMP13 y osteopontina, siendo esto indicador de que las plantillas de cartílago serán reemplazadas por hueso, facilitado por la síntesis

de osteocalcina que induce la mineralización del calcio para formar hueso, por lo tanto la expresión de Sox9 y Colágeno tipo 2 se reduce (11).

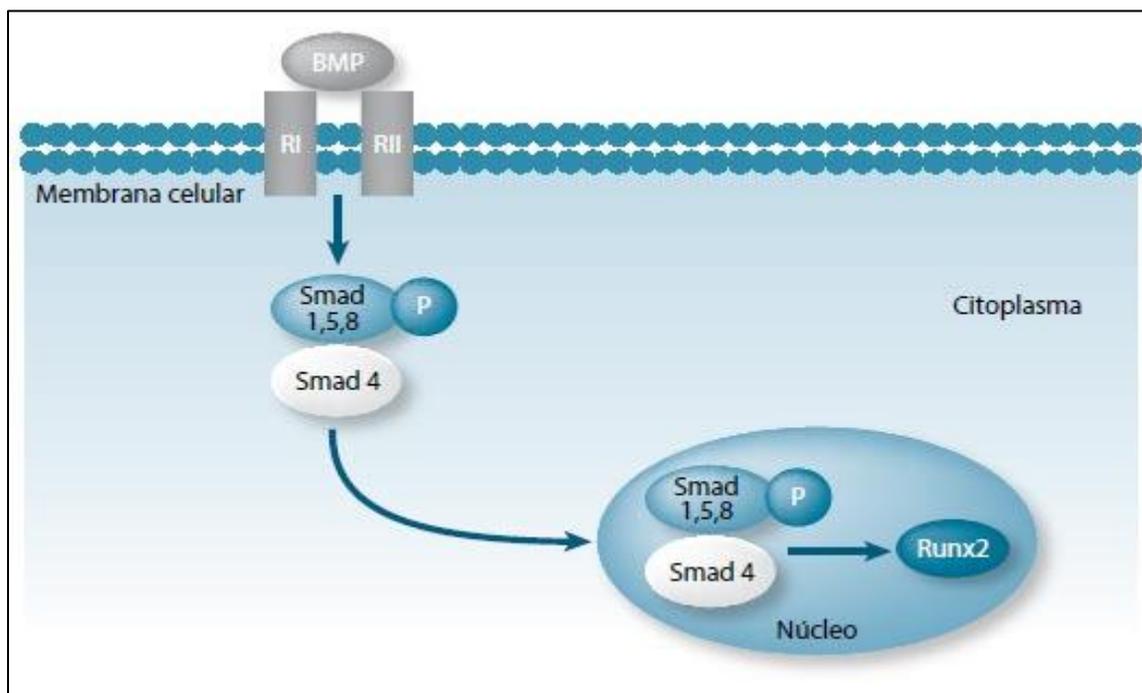


Figura 5. Vía de señalización de BMP's. Unión de BMP a su receptor de membrana tipo serina/treonina cinasa tipo I y tipo II (RI y RII), permitiendo la formación de un complejo heterodimérico que fosforila Smad 1,5,8, una vez activados forman un complejo con Smad4 y luego se translocan al núcleo, donde se unen al ADN, activando Runx2 induciendo la formación de tejido óseo. Adaptado de Chen G. et al. *Int J Biol Sci.* 2012.

El producto final de la condrogénesis asociada con la osificación endocondral será la unidad osteocondral, conformada por cartílago hialino articular, cartílago calcificado y el hueso subcondral. El cartílago hialino articular queda permanente en los extremos de los huesos largos completamente desarrollados (33) donde evita que ocurra fricción entre los mismos, y facilita el movimiento de las articulaciones, además durante el crecimiento forma placas que conducen al alargamiento de los huesos (34). Adicionalmente, cuando se da la maduración esquelética se da el

cierre de la placa de crecimiento donde el cartílago queda constituido por 4 capas: la superficial, media, profunda y calcificada (35), en las cuales se encuentran diferentes tipos de matriz extracelular, es decir que en la capa superficial el contenido de colágeno es mayor que la de proteoglicanos lo cual se invierte a medida que la capa es más profunda (36) (Figura 6).

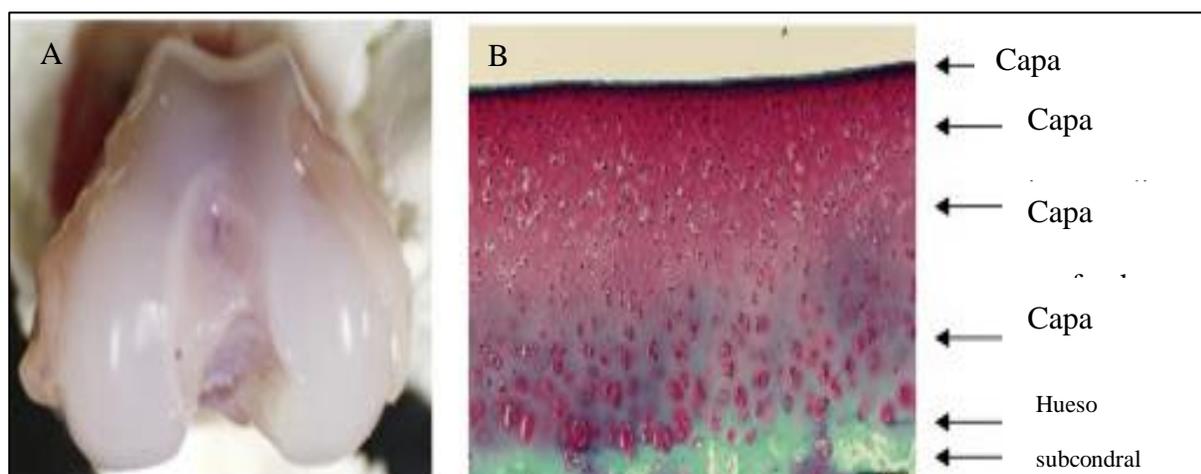


Figura 6. Morfología del cartílago hialino articular. (A) En la imagen de la izquierda se observa una fotografía de cartílago articular sano el cual se caracteriza por tener una superficie lisa, brillante y de color blanco denso, cuando es inmaduro tiene un color azulado, mientras que en una edad avanzada se vuelve amarillo. (B) Se observa un corte histológico donde se aprecian las 4 capas de la estructura cartilaginosa, la zona superficial (tangencial), la zona media (transicional), la zona profunda (radial) y la zona calcificada (36).

Por último, es importante tener en cuenta que el nivel de oxígeno es fundamental durante la condrogénesis ya que la hipoxia en el nicho de las CMM activa la vía p38 MAPK, regulando la expresión de genes que codifican para colágeno tipo II y agregano, así como la activación del factor de transcripción sensible a los niveles de oxígeno, HIF-1 α (factor inducible por hipoxia alfa 1) que induce a su vez la expresión de Sox9 implicado en la diferenciación condrocítica, adicionalmente la hipoxia bloquea directamente la funcionalidad de smad6 y activa HDAC4

(histone deacetylase 4) y Nkx3.2, impidiendo la unión de RUNX2 al ADN, todo esto lleva a la inhibición de la transcripción de genes que codifican para el colágeno tipo X y para MMP-13, reduciendo la hipertrofia de los condrocitos y la producción de tejido óseo (23) (Figura 7).

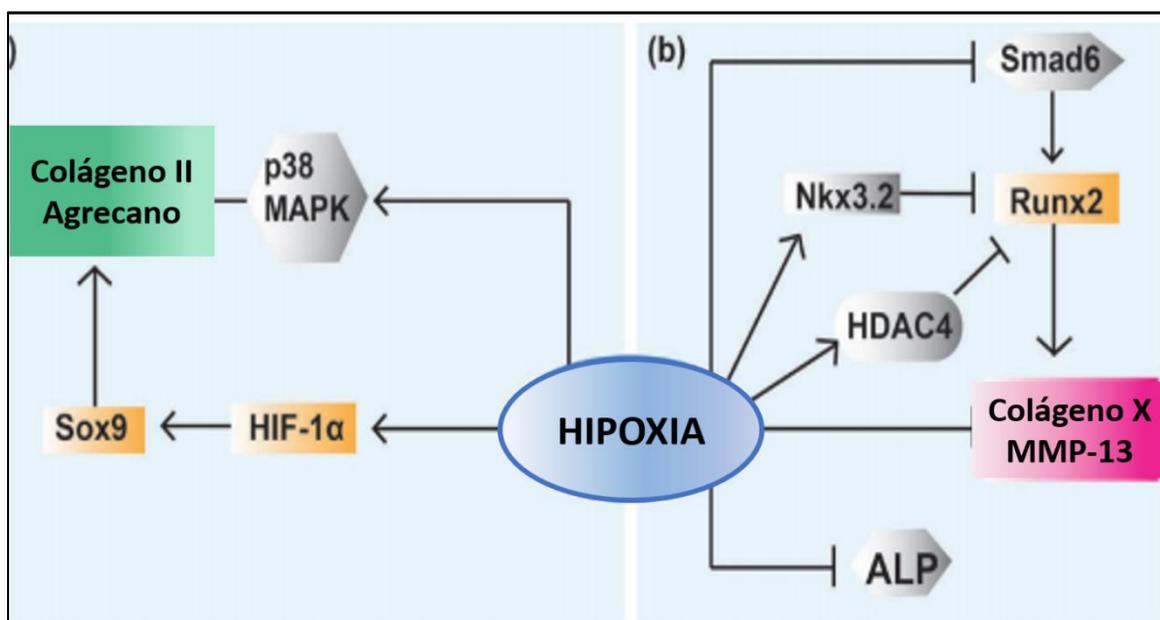


Figura 7. Efectos de la hipoxia en la condrogénesis. Las bajas concentraciones de oxígeno favorecen el desarrollo del cartílago con la expresión de colágeno tipo II y agregano, e inhibiendo la hipertrofia bloqueando a RUNX2 y la consecuente expresión de colágeno tipo X y MMP-13. Adaptado de D Studer et al. European Cells and Materials. 2012 (23).

5.2. Patologías asociadas con degeneración de cartílago hialino articular.

Existen patologías que provocan un daño en la estructura del cartílago hialino articular, el cual no regenera debido a la baja capacidad de reparación y regeneración de los condrocitos en comparación con las células esqueléticas de los huesos, produciendo la degeneración progresiva que lleva a una pérdida en la funcionalidad de la articulación (37). Las patologías que afectan al cartílago hialino articular se pueden clasificar en las enfermedades degenerativas y enfermedades asociadas a trauma (Figura 8).

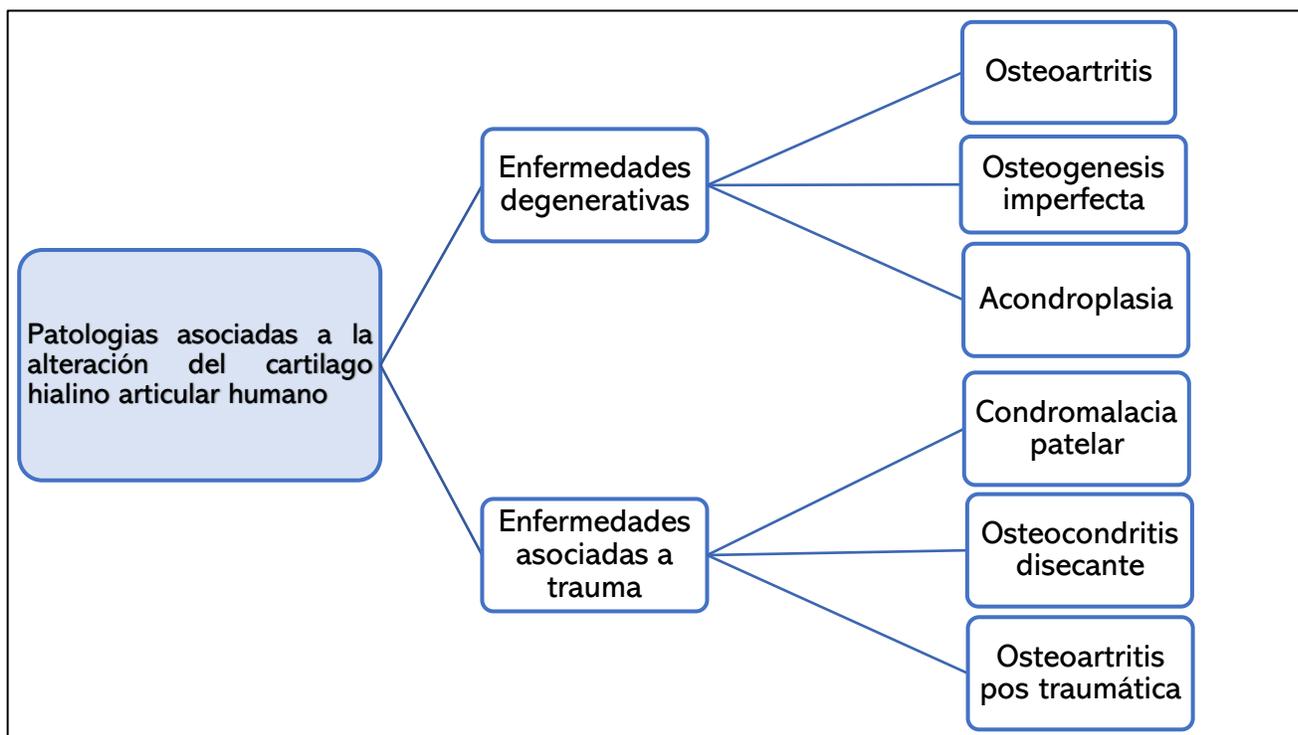


Figura 8. Patologías asociadas a la alteración del cartílago hialino articular. Estas patologías se pueden clasificar en aquellas que degeneran progresivamente la estructura cartilaginosa de la articulación y en enfermedades que como consecuencia de un trauma o del gasto excesivo de la articulación, generan una lesión del cartílago (6, 37).

Una de las enfermedades degenerativas más comunes asociadas con cartílago es la osteoartritis (OA), una enfermedad crónica caracterizada por producir la degeneración del cartílago articular, que conduce a un daño en su estructura, con la formación de quistes subcondrales, estrechamiento del espacio articular, esclerosis subcondral, y formación de osteofitos, afectando la articulación a pesar de que ésta no soporte peso. Los factores de riesgo asociados son la edad, obesidad y estrés mecánico que produce el gasto diario de la articulación con el pasar de los años, por esta razón se presenta principalmente en edad avanzada (38).

La osteogénesis imperfecta (OI) es un trastorno esquelético hereditario causado por una formación ósea defectuosa (39), consecuencia de la mutación en COL1A1 y COL1A2, que codifican para las cadenas $\alpha 1$ y $\alpha 2$ del colágeno tipo I, el más abundante de la matriz extracelular de huesos (40).

De forma similar la acondroplasia es causada por mutaciones autosómicas dominantes en el gen del receptor 3 del FGF, lo cual causa enanismo en humanos. FGF3 se expresa en condrocitos y osteoblastos, además participa en la formación de cartílago y hueso (41).

Dentro de las enfermedades asociadas a trauma se encuentra la osteoartritis postraumática que se desarrolla después de un trauma agudo directo en la articulación (6), donde inicialmente ocurre la muerte celular e inflamación, para terminar en la fase crónica con dolor y disfunción de la articulación, todo ello puede ser causado por una fractura, esguince agudo de ligamentos, lesión en los meniscos e inestabilidad ligamentosa crónica (42). Estas lesiones se clasifican en tres tipos

según la profundidad del daño, puede limitarse solo a la zona superficial, si llega al hueso pero no penetra la médula será subcondral, pero si penetra en la médula ósea (MO) será osteocondral, esta última alcanza al hueso permitiendo que la MO y las células madre mesenquimales promuevan una reparación más eficiente a diferencia de la lesión subcondral, donde la reparación depende de los condrocitos, debido a que el cartílago hialino o articular es avascular (43).

Además en niños y adultos jóvenes, se generan alteraciones osteocondrales como consecuencia de la osteocondritis disecante (OCD), una alteración del hueso subcondral que lleva a la fragmentación del cartílago articular adyacente, causada por trauma repetitivo siendo esta la causa más frecuente de esta patología que afecta a la rodilla la cual es la articulación que se ve comúnmente lesionada, seguido del tobillo y el codo, finalmente esta patología puede volverse crónica y desencadenar una OA prematura (44).

Mientras que la condromalacia patelar, es una enfermedad en la que se da el ablandamiento del cartílago retro patelar, e inflamación que finalmente lleva a deteriorar la articulación, las causas de esta patología son las fracturas, luxaciones, enfermedades reumatológicas, insuficiencia vascular, y estrés mecánico (45).

Por último, es importante tener en cuenta que el dolor articular como síntoma principal de estas patologías se origina en el hueso subcondral subyacente o en tejidos blandos que conforman la cápsula articular, ya que el cartílago no posee terminaciones nerviosas en su estructura, además

causa rigidez y pérdida de función de la articulación, haciendo necesario un tratamiento adecuado para mejorar estos síntomas (33).

5.3. Enfermedades osteoarticulares en Colombia.

Según Aranco y cols la carga de enfermedades crónicas en Colombia para el 2015 fue del 70.1%, (3). Cuervo y cols realizaron una investigación sobre la prevalencia de enfermedades reumáticas en Colombia, donde se encontró que la osteoartritis es la enfermedad reumática más prevalente en hombres con un 11,13% y en mujeres con un 20,31%, dentro de las principales ciudades del país Bogotá es la que presenta un mayor número de casos (46), adicionalmente Londoño y cols estimaron que a la edad de 80 años esta patología afecta a uno de cada 3 individuos en el país(47). Cuervo y cols utilizaron el cuestionario orientado a la comunidad para el control de enfermedades reumáticas COPCORD (Community Oriented Program for Control of Rheumatic Diseases) adaptado para Colombia, con el que se pudo estimar en el año 2015 que el uso o sobrecarga por sobrepeso del aparato musculoesquelético, es la causa principal del desarrollo de patologías que afectan las articulaciones en la población mayor a 50 años con una prevalencia del 10.81% (48).

Reginato y cols, realizaron un estudio demográfico en el año 2015 acerca de la osteoartritis en Latinoamérica, en el cual se encontró que para Colombia la rodilla y la mano eran las dos zonas que más se veían afectadas, destacaban a su vez que la obesidad estaba asociada con el desarrollo de esta patología, y que en su mayoría los pacientes tenían osteoartritis grado 3 según hallazgos radiológicos clasificados con la escala de Kellgren-Lawrence (KL) (49).

5.4. Opciones terapéuticas para la degeneración de cartílago hialino humano.

Existen diversos tratamientos enfocados en disminuir el dolor y tratar los síntomas de la patología que produce daño al cartílago hialino o articular, uno de ellos es a través de la intervención quirúrgica, como el desbridamiento artroscópico simple, conocido como condroplastía (6), que tiene como fin aliviar el dolor, los síntomas mecánicos y los derrames recurrentes asociados con lesiones sintomáticas del cartílago articular, retirando el tejido dañado, dejando una superficie lisa y con bordes estables. Comúnmente los resultados son mejores para lesiones más pequeñas de baja gravedad, sin embargo, con el tiempo se empieza a deteriorar nuevamente la zona de la lesión (50).

Otra opción terapéutica es la microfractura, un procedimiento mínimamente invasivo, útil para lesiones condrales en el que se realizan pequeños agujeros en toda la superficie del cartílago, con el fin de estimular la generación de cartílago al estimular la MO y liberar las células progenitoras al sitio de la lesión, para contribuir en la reparación del daño; sin embargo, estas células forman cartílago fibroso el cual no imita el cartílago hialino en cuanto a su funcionalidad mecánica (51).

Otro tratamiento más avanzado en cuanto a su complejidad es el trasplante autólogo de condrocitos al área de daño, con ayuda de la artroscopia se obtiene una biopsia de cartílago, la cual se cultiva con el fin de expandir la población celular, para posteriormente ser inyectada en la articulación lesionada (52).

5.5. Antecedentes en el uso de la terapia celular con células madre para tratamiento de lesiones en el cartílago hialino humano.

La terapia celular es una técnica de la medicina regenerativa que emplea células madre, células específicas de tejidos, progenitores, o derivados de células madre para ser implantadas en el paciente con el fin de reparar tejidos u órganos deteriorados, que previamente eran considerados irreparables (53).

El primer procedimiento exitoso de terapia celular fue realizado por Richard Gatti y colaboradores en el año 1968, con un trasplante alogénico de células madre hematopoyéticas (CMH) a un paciente que presentaba una deficiencia de linfocitos ligada al sexo (54), casi dos décadas después se consideró relevante el uso de las células madre para la regeneración de tejido esquelético y posteriormente empezaron a adquirir una utilidad terapéutica más amplia (53). Dentro de las enfermedades que son blanco terapéutico de la terapia celular se encuentran las enfermedades: vasculares como la isquemia crítica de extremidades (55), neurológicas, autoinmunes, hepáticas, diabetes, y degenerativas como la osteoartritis (56), la importancia de tratar esta última con terapia celular es que es una patología crónica para lo cual los tratamientos mejoran las manifestaciones clínicas únicamente, por esta razón el objetivo principal es regenerar el cartílago y devolver la integridad a la articulación.

En la actualidad se emplean diversos tipos de células, como las específicas de tejidos (condrocitos, miocitos, y queratinocitos), las células madre embrionarias (CME) y las células madre pluripotentes inducidas (iPSCs), de tejidos adultos o fetales, las células que principalmente

se usan son CMM, CMH, y células madre neuronales (57), con estas células se pueden realizar trasplantes autólogos con células extraídas del mismo individuo o alogénicos a partir de un donante las cuales pueden ser administradas por vía intravenosa, o directamente en la región afectada (56).

Dentro de la terapia celular, las células madre mesenquimales (CMM) se han utilizado ampliamente en el tratamiento de OA (58), debido a que son células multipotentes, que tienen la capacidad de autorrenovarse y diferenciarse en células especializadas del linaje mesodérmico como los osteocitos, adipocitos y condrocitos, siendo estos últimos los de interés. (59)

Actualmente una de las opciones que se viene utilizando es realizar un trasplante autólogo de CMM de médula ósea (CMM-MO), en la articulación dañada, la muestra de MO es tomada de la cresta ilíaca del paciente, y a partir de esta se realiza un cultivo obteniendo células adherentes que luego tripsinizan, y se confirma el inmunofenotipo con la detección de CD44, CD73, CD90 y CD105, en ausencia de antígenos hematopoyéticos como CD34 y CD45, posteriormente las células son inyectadas por medio de artroscopia, alrededor de la lesión en el cartílago, para aliviar el dolor y mejorar la integridad de la superficie del cartílago articular, este procedimiento ha demostrado resultados superiores a los que se han logrado con la microfractura (60).

Dominici y cols realizaron un trasplante autólogo de CMM, a doce pacientes, previamente diagnosticados con OA en la rodilla, los cuales se habían sometido a los tres tratamientos convencionales previamente mencionados, sin resultados favorables, para ello se tomaron muestras de MO, con el fin expandir la población celular por medio de un cultivo (61). Las células

obtenidas fueron trasplantadas por medio de la inyección intraarticular, y después de 3 meses el dolor se redujo, siguiendo una mejora progresiva durante los siguientes 9 meses, además las zonas pobres en cartílago se redujeron en un 27%, lo que indica que hubo una regeneración parcial de la estructura cartilaginosa.(62)

Por otro lado Davatchi y cols aislaron y cultivaron CMM-MO para realizar una inyección intraarticular en la rodilla de pacientes con lesiones en el cartílago, esta inyección se realizó en la zona en la que los pacientes sentían más dolor, posteriormente se mostró mejoría de este síntoma y de la funcionalidad de la articulación, lo cual fue determinado por la capacidad de caminar y desplazarse de cada paciente, luego de 6 meses, empezó a disminuir este resultado y después de 2 años se presentó nuevamente una degeneración de la articulación sin embargo su estado era mucho mejor en comparación con el estado inicial antes de realizar la inyección intraarticular (63).

Adicionalmente se resalta la efectividad de las CMM para mejorar la inflamación de la articulación gracias a su potencial inmunosupresor de citocinas, como la interleucina (IL) -1 β , TNF α , IL-6, IL-15, IL-17 e IL-18, se ha demostrado que la implantación de las células durante la fase inflamatoria de la enfermedad que produce la lesión, mejora el efecto de la terapia (64).

Sin embargo, en la actualidad existen controversias con respecto a las CMM, debido a que su nombre "Mesénquima" es un término histológico para describir un tejido embrionario transitorio que surge principalmente del mesodermo, el cual se desarrolla en tejido conectivo, sangre y vasos sanguíneos, pero no existe una célula después del nacimiento que cumpla estas

funciones, en cambio se ha demostrado que las CMM son células madre o progenitores específicos de tejido, es decir que no se trata de una única célula capaz de diferenciarse en diversos linajes celulares, sino de una célula capaz de recrear el tejido de la cual ha sido aislada. Se postula que posiblemente estas células son pericitos formados a partir de un proceso común con los tejidos conectivos. Durante el desarrollo de un organismo, los vasos sanguíneos no contienen inicialmente pericitos, una vez que vascularizan un tejido capturan células locales que van a diferenciarse en el linaje específico de ese tejido, y las incorporan para transformarlas en pericitos, los cuales permanecen inactivos hasta que por una lesión o como respuesta a la necesidad de formar tejido se activan y contribuyen a la formación del mismo (65).

Además de las CMM también se han descrito células madre asociadas a tejido embrionario como las CME las cuales generan una amplia variedad de tipos celulares *in vitro* en condiciones apropiadas, sin embargo, la investigación en terapia celular empleando este tipo de células madre se ha visto limitado debido a las consideraciones éticas que implica su obtención desde la masa celular interna del blastocisto (66). Crafts y cols, a partir de modelos animales, extrajeron CME de ratón las cuales fueron cultivadas con factores de crecimiento para condrocitos, para después obtener una parte de condrocitos no hipertróficos al inhibir la rutas de señalización de hedgehog y la (BMP), finalmente se trasplantaron estas células a ratones inmunodeficientes, y después de 8 semanas se desarrolló tejido cartilaginoso y hueso en menor medida, demostrando que el manejo adecuado del cultivo *in vitro* permite obtener condrocitos no hipertróficos, y que *in vivo* estos pueden mantener el fenotipo de la estructura del cartílago (67).

Una alternativa para reemplazar a las CME son las iPSCs, Wey y cols obtuvieron estas células a partir de la transformación por medio de transfección, luego se cultivaron con condrocitos humanos, con el fin de que los últimos imitaran el ambiente *in vivo* de la condrogénesis, después de la diferenciación condrogénica se evidencio la presencia de proteoglicanos dentro de la matriz formada, así como niveles de expresión considerables de colágeno y agrecano tipo II, similares a los de condrocitos humanos, finalmente concluyeron que el hecho de realizar el cultivo con estos dos tipos celulares mejora la diferenciación y la formación de una matriz similar a la del cartílago (68). Durante otro ensayo Yamashita y cols, realizaron la diferenciación hacia condrocitos directamente sobre las iPSCs, de manera que inicialmente se indujo la diferenciación en células del mesodermo y luego se cultivaron en un medio suplementado con ácido ascórbico, BMP2 y TGF β 1 los cuales son factores de crecimiento que intervienen en la condrogénesis, finalmente se obtuvieron partículas cartilaginosas con células redondeadas incrustadas en una matriz extracelular, con presencia de proteoglucanos, expresando colágeno tipo II y sin presencia de colágeno tipo X (69).

Recientemente se ha descrito una nueva población celular que se cree posee características propias de una célula madre, denominada célula madre esquelética humana (hSSC- human Skeletal Stem Cell) puede aislarse de MO y del estroma adiposo humano tanto fetal, como adulto si es tratado con BMP2, estas se caracterizan por expresar antígenos como PDPN, CD73, y CD164 en ausencia de CD146. Chan y cols aislaron estas células de dichos tejidos humanos, mostrando la capacidad de autorrenovación y diferenciación a una etapa temprana de hueso, cartílago y estroma progenitor, dando lugar más adelante a condroprogenitores humanos (hCP) antes de la

diferenciación terminal en cartílago. Por otro lado, se puede demostrar que las hSSC empiezan un proceso de proliferación, en callos suaves de muestras de pacientes con fractura, lo cual se comparó con tejido no lesionado, confirmando que tienen un potencial alto de regeneración de tejidos cuando se sufre una lesión aguda (70).

5.5.1. Aislamiento y caracterización de células madre mesenquimales.

Las CMM es una población celular heterogénea que contiene células multipotentes, con la capacidad de autorrenovarse y diferenciarse en células especializadas del linaje mesodérmico como los osteocitos, adipocitos y condrocitos. *In vivo* y durante el desarrollo humano estas células migran para dar origen a células de tejido conectivo como cartílago, huesos, tendones, ligamentos, y músculo(59). Estas se pueden aislar de diferentes tejidos adultos como el tejido adiposo, placenta, cordón umbilical (71), sangre de cordón umbilical (72), pulpa dental (73), entre otros, sin embargo, la MO se considera como el tejido “estandar” de aislamiento (59, 74) y fue el primer tejido a partir del cual se aislaron e identificaron este tipo de células, gracias a las investigaciones de Friedenstein entre 1960 y 1970, donde se aislaron células adherentes fibroblastoides que crecían rápidamente *in vitro* y se diferenciaban en los diferentes linajes celulares anteriormente mencionados(74, 75). Posteriormente el grupo de Arnold Caplan perteneciente a Case Western Reserve University, determinó que estas células tenían un potencial terapéutico importante, ya que después de un trasplante secretan factores esenciales en la regeneración de tejidos, y poseen propiedades inmunomoduladoras. (59, 76).

El porcentaje de CMM que se encuentra en MO oscila entre 0.001 a 0.001 %, por lo tanto, es necesario expandir estas células *in vitro* para su uso en investigación y aplicación clínica (77). Para expandir CMM, se deben aislar CMN a partir de MO utilizando técnicas de separación por gradiente de densidad (Ficoll-Hypaque o Percoll), sin embargo, también pueden ser utilizadas otras técnicas como la lisis de glóbulos rojos, la cual permite utilizar un menor volumen de muestra y evita la pérdida de un porcentaje de células en comparación con el Ficoll (2). Posteriormente se debe realizar el cultivo de las CMN, en diferentes medios de cultivo como el Dulbecco's modified Eagle's (DMEM) o Iscove's Modified Dulbecco's Media con suero fetal bovino o plasma rico en plaquetas (78), pero el uso de suero de origen animal implica un riesgo para ser usado en humanos, por tal razón se han implementado otros medios como MesenCult®-XF Medium (Stemcell Technologies), StemPro® MSC SFM (Life Technologies), MSC Nutristem® XF Medium (Biological Industries), BD Mosaic™ (Becton Dickinson) (79).

Adicional al medio de cultivo, también es importante considerar factores como los niveles de oxígeno los cuales deben imitar el tejido *in vivo* donde se encuentran las células, un ejemplo es la MO donde las concentraciones de oxígeno son del 1 al 5 %, todo ello ya que se ha demostrado que la condición de hipoxia aumenta la proliferación celular, permite el desarrollo del alto potencial regenerativo, y por último prolonga la supervivencia después del trasplante en tejidos dañados(80).

Para el mantenimiento del cultivo se realizan pases con enzimas que permiten separar las células adherentes, para ello se utilizan enzimas como la tripsina, Tryple- E ®, colagenasa, siendo

la tripsina ampliamente usada para realizar el proceso de separación de CMM, sin embargo enzimas recombinantes como la Tryple- E ®, son una buena opción de reemplazo, dando como resultado un proceso de expansión libre de productos de origen animal (81).

La Sociedad Internacional de Terapia Celular estableció en el año 2006, criterios para definir y caracterizar CMM, estos criterios incluyen que: las células deben tener adherencia al plástico, expresar marcadores de superficie celular como CD73, CD105, y CD44 en ausencia de CD34 y CD45, y por último que tengan la capacidad de diferenciarse *in vitro* en adipocitos, condrocitos y osteoblastos (82). Sin embargo, en la actualidad esta caracterización está en discusión porque el fenotipo puede variar según el tejido de aislamiento y las condiciones de cultivo. El fenotipo establecido en el año 2006 es inespecífico ya que establece la identificación de un fenotipo definido para una población celular homogénea, sin embargo, hoy en día se reconoce que las CMM constituyen una población heterogénea de células multipotentes, que expresa diferentes antígenos de superficie, esta heterogeneidad está dada por los diversos tipos celulares aislados del tejido, la heterogeneidad introducida por el cultivo mismo y por las diferentes fuentes de tejido(83). Por ultimo la definición que se otorga de célula madre, como un progenitor común de todos los derivados del mesoderma, y capaz de mantener el microambiente de las CMH, no se ajusta a la evidencia experimental que se ha obtenido en la que se ha demostrado que las CMM pueden ser inducidas para diferenciarse y ser pluripotentes pero *in vivo* no tienen esta capacidad, así mismo existen controversias en cuanto a si verdaderamente es una célula madre, debido a que se ha observado que en sí misma no lo es, pero tienen la habilidad de modular las funciones de las células propias del tejido, que posiblemente si tienen características de célula

madre, como las recientemente descubiertas hSSC (70, 83). Adicionalmente, la universidad Javeriana está liderando la norma ISO para unificar criterios de células madre mesenquimales/estromales para su uso en investigación (84)

5.5.2. Aislamiento y caracterización de células madre embrionarias.

Las CME son células madre pluripotentes derivadas de la masa celular interna del blastocisto, las cuales tienen la capacidad de diferenciarse en todos los linajes celulares de un organismo vivo, y de mantener un estado indiferenciado durante el cultivo in vitro, por esta razón han sido consideradas como una opción terapéutica de importancia en la generación de células especializadas para reemplazar tejido dañado en pacientes que padecen enfermedades degenerativas (85, 86). Sin embargo, para el aislamiento de la masa celular interna del blastocisto se utiliza disección mecánica, lo que tiene como consecuencia la destrucción del embrión en desarrollo, por esta razón esta técnica tiene implicaciones éticas y morales, llegando a prohibirse en diferentes países (87).

Luego de la obtención de las células, se deben mantener en cultivos adecuados cuyo principal propósito sea mantener la capacidad de auto renovación de las CME, para ello se emplean capas alimentadoras MEF (Mouse embryonic fibroblasts – MEF), sin embargo para eliminar el uso de productos de origen animal, surgieron nuevos sistemas de cultivo libres de proteínas de origen animal (Xeno-free culturing systems) en los cuales se emplean diversos tipos de poblaciones celulares humanas como fibroblastos derivadas del epitelio de las trompas de Falopio, precucio fetal, músculo, células del estroma de MO humana (88), o epitelio amniótico(86). Otra

opción de cultivo libre de células de alimentación, es usar una matriz extracelular como el matrigel o fibronectina, en la cual hay CME que se diferencian en fibroblastos y estos pueden mantener a las otras CME indiferenciadas del mismo cultivo (89), adicionalmente se pueden añadir factores que tienen la capacidad de mantener la renovación y pluripotencia de las células, que se son producidos por la placa de alimentación MEF, también se ha observado que a altas concentraciones de FGF y con la inhibición de la vía de señalización de BMP mantiene la proliferación de las CME. Posteriormente, para expandir la población se deben realizar varios pases y transferirse a nuevos cultivos, esto se realiza por medio de disociación enzimática con colagenasa IV, dispasa, y tripsina, o por enzimas recombinantes (86).

Por último para caracterizarlas se detecta la expresión de una serie de antígenos de superficie que sean específicos para las CME, como los denominados SSEA (SSEA-Stage Specific Embryonic Antigens, por sus siglas en inglés), que son moléculas implicadas en controlar las interacciones de la superficie celular durante el desarrollo, dentro de estos las CME expresan SSEA-4, en ausencia de SSEA-1, otros antígenos que pueden ser detectados son el CD9, CD24, CD90, CD133, y CD117 (85).

5.5.3. Aislamiento y caracterización de células madre pluripotentes inducidas.

Una alternativa para reemplazar el uso de CME es transformar células somáticas en poblaciones celulares para adquirir características de células embrionarias a un estado pluripotente mediante reprogramación directa, obteniendo iPSC que dan origen a células de las tres capas germinales (90). Por primera vez en 2006 Kazutoshi Takahashi y Shinya Yamanaka demostraron

que se podían generar este tipo de células a partir de fibroblastos embrionarios de ratón y fibroblastos de la punta de cola de ratón adulto, mediante transfección a través de retrovirus de factores de transcripción, Oct3 / 4, Sox2, c-Myc, Klf4, Nanog 9, y Sox 2 (Factores de Yamanaka), un año después y usando los mismo factores se pudieron obtener iPSC a partir de células humanas, con el uso de estos factores (91), sin embargo, aún existen limitaciones para el uso en terapia celular debido a las mutaciones *de novo* que se dan durante el proceso de reprogramación y durante el cultivo de iPSC (90).

Como se mencionó anteriormente, las iPSC pueden obtenerse a partir de células somáticas de diversos tejidos animales o humanos, dentro de los tipos de células humanas como hepatocitos, células epiteliales gástricas, queratinocitos, células estomacales, células mesenquimales, células madre neurales, células pancreáticas, linfocitos B y T, CMH, células madre de tejido adiposo, células de sangre de cordón, células de sangre periférica, pero usualmente se emplean fibroblastos dérmicos debido a su accesibilidad y eficiencia en la reprogramación, (92).

El cultivo de las iPSC se realiza en medios como el DMEM, suplementado con suero humano e incubado at 37°C, después de 2 a 4 semanas se realizan pases cada dos días, durante lo cual se realizan curvas de crecimiento de la población celular (93), para la transfección se emplean soluciones con el vector retroviral que contiene los factores de Yamanaka, que se desean insertar en el material genético de las células humanas, posteriormente el cultivo se debe mantener en placas de crecimiento con diferentes componentes como puede mitomicina(94), vitronectina que es una matriz para el cultivo celular apoyando el crecimiento y la diferenciación de células madre

pluripotentes humanas, o substrato que contengan componentes solo de origen humano como CELLstart™, inicialmente las células se mantienen 6-7 días con fibroblastos humanos, luego se pasan sobre una línea celular para realizar un co-cultivo con fibroblastos de embrión de ratón (95).

Por último se debe realizar la caracterización de las células obtenidas, para lo cual se realizan diferentes pruebas dentro de las cuales está la detección de proteínas asociadas con pluripotencia por citometría de flujo como TRA-1-60 y TRA-1-81, pruebas de diferenciación *in vivo*, inyectando las iPSCs en un ratón inmunodeficiente con el fin de observar la formación de un teratoma, e *in vitro* con la formación del cuerpo embriónico para demostrar la habilidad de las células para diferenciarse en las tres capas germinales, adicionalmente se puede monitorear la estabilidad genética de esta población celular mediante el análisis de cariotipo de banda G, lo que ha permitido la detección de grandes duplicaciones de genes que podrían afectar la pluripotencia y el potencial de diferenciación. (96, 97).

5.5.4. Aislamiento y caracterización de células madre esqueléticas humanas.

Los cultivos de CMM obtenidas de MO contienen poblaciones de células heterogéneas con potenciales de diferenciación a diversos linajes como hueso, cartílago, grasa, músculo, fibroblastos, células endoteliales y estroma, sin embargo el grupo logró aislar una nueva población celular capaz de autorrenovarse y diferenciarse a diferentes linajes dando origen a hueso, cartílago y estroma, esta población celular corresponde a las hSSCs (Human Skeletal Stem Cell), las cuales pueden ser aisladas de varios tejidos humanos como la cabeza del fémur, aspirados de

MO y del estroma adiposo humano tanto fetal, como adulto, finalmente para su caracterización se determina la expresión de antígenos PDPN, CD73, y CD164 en ausencia de CD146. (70)

5.6. Avances de la biotecnología en el uso de células madre para medicina regenerativa.

La terapia con células madre se ha convertido en un campo de investigación prometedor para la medicina regenerativa, con la que se podrían tratar enfermedades degenerativas que hasta ahora no tenían tratamiento definitivo, gracias a las propiedades inmunomoduladoras, de reparación de varios tejidos, así como del potencial de diferenciación que poseen estas células.(59) Actualmente existen registrados más de 1000 ensayos clínicos en el uso de células madre en ClinicalTrials.gov sin embargo actualmente existen retos para su uso en pacientes, ya que primero se debe entender por completo el funcionamiento en modelos animales, pues representan un riesgo en el desarrollo de tumores al ser células que *in vivo* pueden proliferan y diferenciarse incontroladamente, segundo se debe entender cómo se da la tolerancia inmunológica entre las células madre y el paciente, por esta razón ahora se emplean propias células del paciente, las cuales son inducidas a un estado pluripotente para ser nuevamente transferidas al organismo, para ello hoy en día existen bancos de tejido de los cuales se pueden obtener células madre (23, 59). También se están empezando a desarrollar nuevos sistemas como los organoides que imiten y permitan estudiar la integridad de órganos y tejidos (98).

5.6.1. Cultivo celular 3D.

In vivo el microambiente de las células madre está compuesto por otras células y matriz extracelular, todo ello está organizado en una estructura tridimensional (3D). Cuando se realizan cultivos celulares se busca imitar de la manera más precisa estas características, sin embargo con el cultivo 2D no se tiene en cuenta este microambiente tridimensional por el contrario las células se ubican en monocapas (99), gracias a ello se han desarrollado cultivos celulares 3D que imitan la fisiología natural de la célula, ya que les permiten crecer en todas las direcciones así como lo hacen naturalmente en el tejido (100).

En los cultivos 3D el crecimiento celular se da en agregados o esferoides, sobre un andamio/matriz o sin andamios. Los cultivos que se realizan sobre andamios pueden formarse sembrando las células en una matriz 3D acelular o dispersando células en una matriz líquida que posteriormente se solidifica o polimeriza, para esta matriz se emplean materiales sintéticos como el polietilenglicol y alcohol polivinílico o derivados de compuestos biológicos como el matrigel, el extracto de membrana basal, y ácido hialurónico, uno de los métodos usados son los canales de microfluidos (100) . Por otro lado los esferoides formados sin andamios son generados a partir de suspensiones utilizando técnicas como el “hanging drop”, flotación forzada, métodos basados en agitación (101), el primero es el más común en el que se emplea una gota compuesta de medio de cultivo donde se da la agregación celular espontanea a causa de la gravedad, esta gota cuelga de la parte superior de una placa de cultivo. Con todos estos métodos, las células crecen en un entorno 3D, que les permite interactuar entre sí, con la matriz extracelular y su microambiente, esto tiene efectos en la proliferación celular, la diferenciación, la morfología, la expresión de genes y

proteínas, y la respuesta a estímulos externos. (101) (Figura 9). Finalmente, los esferoides quedan compuestos de células altamente proliferativas, no proliferativas y apoptóticas con difusión limitada de oxígeno al centro del esferoide, por tal conduce a la formación de un entorno hipóxico en aumento.

Para el cultivo 3D se emplean diversos tipos celulares como las CME, iPSCs, y células madre adultas como las CMM (102), se ha demostrado que el cultivo 3D de CMM mejora sus propiedades terapéuticas debido a que después de 3 días de cultivo hubo una mayor expresión de factores antiinflamatorios, adicionalmente, mostraron una mayor diferenciación condrogénica. Por último uno de los grandes usos del cultivo 3D es la formación de organoides, a partir de la formación de estos esferoides (103).

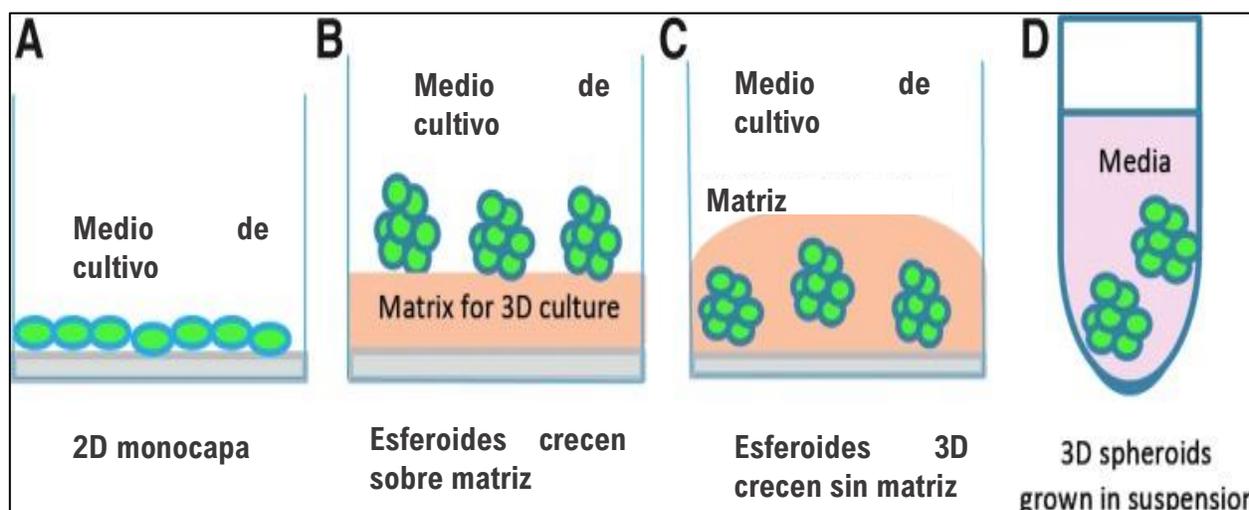


Figura 9. Tipos de cultivos celulares 3D (A) Cultivo en 2D, donde las células se ubican en monocapa. (B, C) Cultivos en 3D para formar esferoides usando una matriz extracelular. (D) Esferoides que crecen en suspensión sin matriz extracelular. Adaptado de Edmondson R. *Assay Drug Dev Technol.* 2014.

5.6.2. Organoides.

Los organoides son sistemas de cultivo celular complejo que para su formación se requiere la proliferación, diferenciación en linajes específicos, morfogénesis y reorganización de células, para dar como resultado una estructura compleja y organizada que imita características y funciones de un órgano. (104) Usualmente se emplean iPSCs derivadas de fibroblastos, las cuales se cultivan con factores que activen o inhiban vías de señalización específicas sobre matrices que imitan el soporte o “andamio” proporcionado por la matriz extracelular en el tejido *in vivo*, para esto existen diversas clases de materiales como tejidos descelularizados (por ejemplo matrigel de sarcoma de ratón) o biopolímeros naturales (hidrogel de colágeno), finalmente se pueden obtener estructuras en diferentes etapas de desarrollo, cuando la proliferación y diferenciación es temprana se obtienen organoides en etapa temprana, también conocidos como esferoides, por otro lado los organoides de etapa tardía son estructuras que contienen células correctamente orientadas y especializadas hacia un linaje, y muestran procesos similares a los de un órgano, cabe resaltar que su complejidad puede ser mejoradas con diferentes técnicas de biofabricación en la que se usan como base organoides para formar sistemas aún más especializados (98, 104).

5.6.3. Bioimpresión.

La bioimpresión es una técnica que permite el ensamblaje de materiales vivos y sintéticos, es decir células con materiales para la matriz extracelular y factores biológicamente activos en estructuras más complejas con una arquitectura 2D o 3D, que imitan órganos y tejidos vivos, con el fin de ser empleadas en estudios de medicina regenerativa generando tejidos trasplantables como piel, cartílago, hueso, vasos sanguíneos tejido hepático y tejido cardiaco (105) , también se usa en

farmacocinética y biología celular básica (106). Esta técnica puede emplear múltiples tipos de células primarias del tejido nativo o células madre que gracias a pueden proliferar y diferenciarse en los tipos celulares requeridos, la ventaja de las últimas es que se pueden obtener de manera autóloga disminuyendo la probabilidad de rechazo del trasplante, con el descubrimiento de las iPSC ahora es posible obtener células madre con la capacidad de diferenciarse en cualquier linaje a partir de células maduras como fibroblastos cutáneos por biopsia de piel, lo que evita realizar procedimientos invasivos en el paciente (107). La bioimpresión 3D fue descrita por primera vez en 1986 por Charles W. Hull, con el nombre de 'esterolitografía', donde se producían secuencialmente capas delgadas de un material hasta formar una estructura 3D, el desarrollo de esta técnica permitió la impresión de andamios compuestos por materiales biológicos que podrían usarse en trasplante con o sin células sembradas (108).

El proceso de bioimpresión requiere de "bioinks o biotintas" que contienen hidrogeles compuestos de polímeros sintéticos (polietileno o glicol) o naturales (alginato, colágeno y ácido hialurónico, y células. Primero se debe realizar el aislamiento de las células seleccionadas, que posteriormente se cultivan para expandir su población, luego dentro de la biotinta se almacenan estas células junto con el hidrogel para empezar la impresión de andamios con la geometría seleccionada previamente (Figura 9a), por último existen diferentes métodos de bioimpresión, dentro de las cuales una de las más utilizadas es la impresión de inyección de tinta que utiliza fuerzas térmicas o acústicas para expulsar secuencialmente pequeñas gotas de células e hidrogel sobre un sustrato, que puede formar parte de la construcción final, también existen las bioimpresoras láser, las bioimpresoras de extrusión y las impresoras estereolitográficas (Figura 9b, c,d,e) (108, 109).

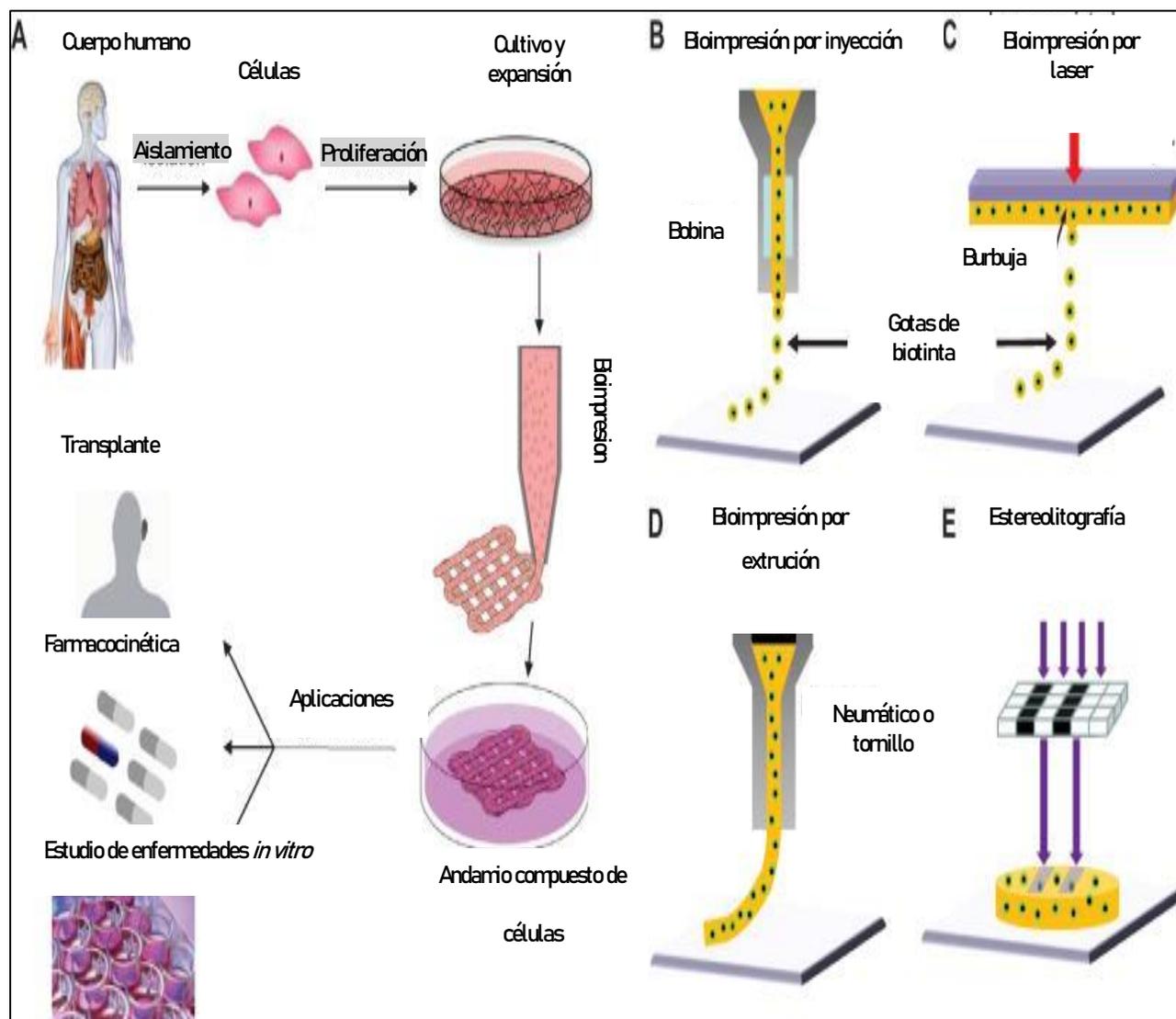


Figura 10. Bioimpresión. (A) Proceso de bioimpresión: Primero se realiza el aislamiento de células, para posteriormente cultivarlas e incluirlas en biotintas para construir el andamio. (B) Impresoras de inyección de tinta expulsan pequeñas gotas de células e hidrogel secuencialmente para formar el andamio. (C) Bioimpresoras (D) Bioimpresoras de extrusión (E) estereolitografía. Adaptado de Mandrycky C, et al. *Biotechnol Adv.* 2016 (109).

6. Discusión

El daño en el cartílago hialino articular producido por patologías como la osteoartritis ha planteado grandes retos para la medicina regenerativa, ya que después de una lesión el cartílago no se regenera con facilidad. Los ensayos experimentales realizados para lograr regenerar este tejido tienen como objetivo obtener cartílago *in vitro* con características similares al encontrado naturalmente en la articulación, en cuanto a componentes estructurales y funcionalidad, para ello es importante imitar el microambiente natural por el cual se origina esta estructura. Por tal motivo es importante conocer el proceso de la condrogénesis, y de diferenciación hacia condrocitos con el fin de incluir factores implicados en este proceso en el mejoramiento de los protocolos empleados en la regeneración de cartílago. Sería de gran interés desarrollar trabajos experimentales teniendo en cuenta dos factores esenciales, como la condición de hipoxia y el uso de factores de crecimiento específicos para diferenciación condrogénica como el TGF- β , bloqueando la hipertrofia y la consecuente formación de tejido óseo que significaría el fracaso de las terapias de regeneración de cartílago en los pacientes.

El propósito de las terapias para regeneración de cartílago es proporcionar una opción terapéutica alternativa para tratar enfermedades que afectan al cartílago hialino articular, las cuales actualmente son tratadas con procedimientos quirúrgicos que presentan limitaciones como los trasplantes autólogos de condrocitos que pueden resultar en la hipertrofia de estos condrocitos en la articulación del paciente, ocasionando un daño mayor al tejido, además no garantizan una recuperación total de la movilidad a largo plazo. Una opción prometedora es la terapia con células madre que emplea CMM, CME, y las iPSCs, sin embargo, las CME no son una buena fuente para

terapia debido a las implicaciones éticas que conlleva su obtención, por otro lado, a partir de CMM se ha logrado producir cartílago *in vitro*, pero por ser una población heterogénea de células multipotentes aumenta la probabilidad de que los condrocitos se vuelvan hipertróficos una vez sean implantados en el tejido. Una opción ideal es utilizar las iPSCs dado que estas pueden obtenerse en una cantidad significativa a partir de tejidos propios del paciente y con procedimientos mínimamente invasivos, además de tener un alto potencial en el campo de la medicina regenerativa debido a que es una población celular que puede ser inducida a diferenciarse en diversos linajes celulares, incluidos los condrocitos, sin embargo tienen una gran inestabilidad genómica que puede resultar en la formación de tumores, lo que implica que sea de gran importancia continuar la investigación para encontrar métodos de cultivo y transformación que disminuyan el riesgo de que se produzcan mutaciones genéticas.

El uso de las nuevas tecnologías desarrolladas a partir de la biotecnología es de gran interés para la medicina regenerativa ya que permiten un acercamiento a modelar e imitar el microambiente natural de un tejido, lo que implica avances en el desarrollo y mejoramiento de la terapia con células madre para la regeneración de cartílago, cabe resaltar la importancia del cultivo celular 3D al ser una técnica con ventajas sobre el cultivo celular tradicional, porque permite que las células madre interactúen con su microambiente así como lo realizan *in vivo*, lo cual es determinante en la formación de nuevos tejidos, adicionalmente la creación de organoides a partir de la bioimpresión es una buena alternativa para regenerar cartílago, ya que al contar con una similaridad al tejido específico al cual se desean trasplantar, aumentan la probabilidad de que este

se regenere efectivamente y evita en gran medida que se forme hueso, aspecto que con el trasplante de células madre podría ser difícil de controlar.

Por último, la terapia con células madre utilizando organoides promete ser una opción terapéutica viable para el tratamiento de las lesiones de cartílago, siempre y cuando se continúen las investigaciones en este campo de manera que se logre demostrar la efectividad de estos tratamientos antes de ser probados en humanos.

7. Perspectivas

Esta monografía será ajustada a los requerimientos de la revista Colombiana de Ortopedia y traumatología para su publicación en el primer semestre de 2020, con la asesoría del Departamento de Ortopedia y Traumatología del Hospital Universitario San Ignacio.

8. Conclusiones

- Claramente se ha demostrado que durante los procesos de producción de cartílago los niveles de oxígeno y factores de transcripción son determinantes, una propuesta interesante sería realizar diferenciación condrogénica con bajos niveles de oxígeno bloqueando factores de transcripción como RUNX2 implicados en la formación de hueso.
- La osteoartritis es la enfermedad articular más frecuente en Colombia, generando a su vez altas tasas de morbilidad en la población, ya que esta enfermedad causa la

degeneración del tejido cartilaginoso, por esta razón es un blanco terapéutico de interés para la medicina regenerativa.

- La capacidad de autorrenovación y diferenciación han convertido a las células madre en una alternativa terapéutica de importancia para el tratamiento de las enfermedades osteoarticulares, mejorando la integridad del tejido y la sintomatología de la enfermedad, lo que podría reemplazar a los tratamientos convencionales.

- Los avances que se han realizado en el campo de la biotecnología son prometedores para mejorar la terapia celular como opción terapéutica de enfermedades osteoarticulares, debido a que permiten desarrollar estructuras útiles para trasplantes con características similares a las del cartílago, que tiene como consecuencia una mejor compatibilidad con el tejido in vivo del paciente.

9. Bibliografía

1. (CEPAL) CEpALyeC. Derechos de las personas mayores: retos para la interdependencia y autonomía. Santiago: Naciones Unidas; 2017.
2. Población NUDd. World Population Prospects 2019 [Available from: <https://population.un.org/wpp/Maps/>]
3. Aranco N, Stampini M, Ibararán P, Medellín N. Panorama de envejecimiento y dependencia en América Latina y el Caribe. Biblioteca Banco interamericano de desarrollo; 2018.
4. Colombia Mdsypsd. Encuesta nacional de salud y envejecimiento 2018.
5. Salud INd. Biomédica. Revista del Instituto Nacional de Salud. 2018.

6. Chubinskaya S, Haudenschild D, Gasser S, Stannard J, Krettek C, Borrelli J. Articular Cartilage Injury and Potential Remedies. *J Orthop Trauma*. 2015;29 Suppl 12:S47-52.
7. Rehfeld Aa, Nylander Ma, Karnov Ka. *Compendium of histology : a theoretical and practical guide*.
8. Fortoul T, Rodríguez V, Carrillo P, Colín L, Esperón D, González A, et al. *Histología y biología celular*. 3 ed. Ciudad de México. McGraw-Hill; 2017.
9. Gilbert SF, Barresi MJF. *Developmental biology*. Eleventh edition. ed.
10. Thomas S, Langman J. *Embriología médica*. 10 ed ed: Editorial Médica Panamericana; 2007.
11. Li J, Dong S. The Signaling Pathways Involved in Chondrocyte Differentiation and Hypertrophic Differentiation. *Stem Cells Int*. 2016;2016:2470351.
12. Moore KLa, Persaud TVNa, Torchia MGa. *Before we are born : essentials of embryology and birth defects*.
13. Gao L, Orth P, Cucchiaroni M, Madry H. Effects of solid acellular type-I/III collagen biomaterials on in vitro and in vivo chondrogenesis of mesenchymal stem cells. *Expert Rev Med Devices*. 2017;14(9):717-32.
14. Kwon H, Paschos NK, Hu JC, Athanasiou K. Articular cartilage tissue engineering: the role of signaling molecules. *Cell Mol Life Sci*. 2016;73(6):1173-94.
15. Tuan RS. Cellular signaling in developmental chondrogenesis: N-cadherin, Wnts, and BMP-2. *J Bone Joint Surg Am*. 2003;85-A Suppl 2:137-41.
16. Green JD, Tollemar V, Dougherty M, Yan Z, Yin L, Ye J, et al. Multifaceted signaling regulators of chondrogenesis: Implications in cartilage regeneration and tissue engineering. *Genes Dis*. 2015;2(4):307-27.
17. Keller B, Yang T, Chen Y, Munivez E, Bertin T, Zabel B, et al. Interaction of TGF β and BMP signaling pathways during chondrogenesis. *PLoS One*. 2011;6(1):e16421.
18. Wu M, Chen G, Li YP. TGF- β and BMP signaling in osteoblast, skeletal development, and bone formation, homeostasis and disease. *Bone Res*. 2016;4:16009.
19. Thielen NGM, van der Kraan PM, van Caam APM. TGF β /BMP Signaling Pathway in Cartilage Homeostasis. *Cells*. 2019;8(9).

20. Lefebvre V, Dvir-Ginzberg M. SOX9 and the many facets of its regulation in the chondrocyte lineage. *Connect Tissue Res.* 2017;58(1):2-14.
21. van der Kraan PM, Blaney Davidson EN, Blom A, van den Berg WB. TGF-beta signaling in chondrocyte terminal differentiation and osteoarthritis: modulation and integration of signaling pathways through receptor-Smads. *Osteoarthritis Cartilage.* 2009;17(12):1539-45.
22. Zhong L, Huang X, Karperien M, Post JN. The Regulatory Role of Signaling Crosstalk in Hypertrophy of MSCs and Human Articular Chondrocytes. *Int J Mol Sci.* 2015;16(8):19225-47.
23. Studer D, Millan C, Öztürk E, Maniura-Weber K, Zenobi-Wong M. Molecular and biophysical mechanisms regulating hypertrophic differentiation in chondrocytes and mesenchymal stem cells. *Eur Cell Mater.* 2012;24:118-35; discussion 35.
24. Nicolae C, Ko YP, Miosge N, Niehoff A, Studer D, Enggist L, et al. Abnormal collagen fibrils in cartilage of matrilin-1/matrilin-3-deficient mice. *J Biol Chem.* 2007;282(30):22163-75.
25. Kozhemyakina E, Lassar AB, Zelzer E. A pathway to bone: signaling molecules and transcription factors involved in chondrocyte development and maturation. *Development.* 2015;142(5):817-31.
26. Tagariello A, Luther J, Streiter M, Didt-Koziel L, Wuelling M, Surmann-Schmitt C, et al. Ucma--A novel secreted factor represents a highly specific marker for distal chondrocytes. *Matrix Biol.* 2008;27(1):3-11.
27. Eitzinger N, Surmann-Schmitt C, Bosl M, Schett G, Engelke K, Hess A, et al. Ucma is not necessary for normal development of the mouse skeleton. *Bone.* 2012;50(3):670-80.
28. Surmann-Schmitt C, Dietz U, Kireva T, Adam N, Park J, Tagariello A, et al. Ucma, a novel secreted cartilage-specific protein with implications in osteogenesis. *J Biol Chem.* 2008;283(11):7082-93.
29. Saavedra J DA. *Texto Atlas de Histología. Biología celular y tisular. 2e* Eds ed. Nueva York: McGraw-Hill; 2014.

30. Wang RN, Green J, Wang Z, Deng Y, Qiao M, Peabody M, et al. Bone Morphogenetic Protein (BMP) signaling in development and human diseases. *Genes Dis.* 2014;1(1):87-105.
31. Zhou J, Wei X, Wei L. Indian Hedgehog, a critical modulator in osteoarthritis, could be a potential therapeutic target for attenuating cartilage degeneration disease. *Connect Tissue Res.* 2014;55(4):257-61.
32. Yan D, Chen D, Im H-J. Fibroblast growth factor-2 promotes catabolism via FGFR1-Ras-Raf-MEK1/2-ERK1/2 axis that coordinates with the PKC δ pathway in human articular chondrocytes. *Journal of Cellular Biochemistry.* 2012;113(9):2856-65.
33. Lepage SIM, Robson N, Gilmore H, Davis O, Hooper A, St John S, et al. Beyond Cartilage Repair: The Role of the Osteochondral Unit in Joint Health and Disease. *Tissue Eng Part B Rev.* 2019;25(2):114-25.
34. Palukuru UP, McGoverin CM, Pleshko N. Assessment of hyaline cartilage matrix composition using near infrared spectroscopy. *Matrix Biol.* 2014;38:3-11.
35. Poole CA. Articular cartilage chondrons: form, function and failure. *J Anat.* 1997;191 (Pt 1):1-13.
36. Carballo CB, Nakagawa Y, Sekiya I, Rodeo SA. Basic Science of Articular Cartilage. *Clin Sports Med.* 2017;36(3):413-25.
37. Goldring MB, Goldring SR. Articular cartilage and subchondral bone in the pathogenesis of osteoarthritis. *Ann N Y Acad Sci.* 2010;1192:230-7.
38. Kristjánsson B, Honsawek S. Mesenchymal stem cells for cartilage regeneration in osteoarthritis. *World J Orthop.* 2017;8(9):674-80.
39. Tauer JT, Robinson ME, Rauch F. Osteogenesis Imperfecta: New Perspectives From Clinical and Translational Research. *JBMR Plus.* 2019;3(8):e10174.
40. Forlino A, Marini JC. Osteogenesis imperfecta. *Lancet.* 2016;387(10028):1657-71.
41. Ornitz DM, Legeai-Mallet L. Achondroplasia: Development, pathogenesis, and therapy. *Dev Dyn.* 2017;246(4):291-309.

42. Punzi L, Galozzi P, Luisetto R, Favero M, Ramonda R, Oliviero F, et al. Post-traumatic arthritis: overview on pathogenic mechanisms and role of inflammation. *RMD Open*. 2016;2(2):e000279.
43. Karuppall R. Current concepts in the articular cartilage repair and regeneration. *J Orthop*. 2017;14(2):A1-A3.
44. Krishnan Y, Grodzinsky AJ. Cartilage diseases. *Matrix Biol*. 2018;71-72:51-69.
45. Resorlu H, Zateri C, Nusran G, Goksel F, Aylanc N. The relation between chondromalacia patella and meniscal tear and the sulcus angle/ trochlear depth ratio as a powerful predictor. *J Back Musculoskelet Rehabil*. 2017;30(3):603-8.
46. Cuervo F, Cuervo F, Santos A, Saldarriaga E. Prevalencia de las enfermedades reumáticas en Colombia. *Medicina*; 2018. p. 94-5.
47. Londoño J, Peláez Ballestas I, Cuervo F, Angarita I, Giraldo R, Rueda JC, et al. Prevalence of rheumatic disease in Colombia according to the Colombian Rheumatology Association (COPCORD) strategy. Prevalence study of rheumatic disease in Colombian population older than 18 years. *Revista Colombiana de Reumatología*. 2018;25:245-56.
48. Cuervo F, Angarita I, Santos AM, Saldarriaga E-L, Rueda JC, Ballesteros JG, et al. AB1205 BURDEN DISEASE OF OSTEOARTHRITIS IN COLOMBIA, 2015. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2019;78(Suppl 2):2064-.
49. Reginato AM, Riera H, Vera M, Torres AR, Espinosa R, Esquivel JA, et al. Osteoarthritis in Latin America: Study of Demographic and Clinical Characteristics in 3040 Patients. *J Clin Rheumatol*. 2015;21(8):391-7.
50. Anderson DE, Rose MB, Wille AJ, Wiedrick J, Crawford DC. Arthroscopic Mechanical Chondroplasty of the Knee Is Beneficial for Treatment of Focal Cartilage Lesions in the Absence of Concurrent Pathology. *Orthop J Sports Med*. 2017;5(5):2325967117707213.
51. Glyn-Jones S, Palmer AJ, Agricola R, Price AJ, Vincent TL, Weinans H, et al. Osteoarthritis. *Lancet*. 2015;386(9991):376-87.
52. Minas T, Von Keudell A, Bryant T, Gomoll AH. The John Insall Award: A minimum 10-year outcome study of autologous chondrocyte implantation. *Clin Orthop Relat Res*. 2014;472(1):41-51.

53. Heathman TR, Nienow AW, McCall MJ, Coopman K, Kara B, Hewitt CJ. The translation of cell-based therapies: clinical landscape and manufacturing challenges. *Regen Med.* 2015;10(1):49-64.
54. Gatti RA, Meuwissen HJ, Allen HD, Hong R, Good RA. Immunological reconstitution of sex-linked lymphopenic immunological deficiency. *Lancet.* 1968;2(7583):1366-9.
55. Qadura M, Terenzi DC, Verma S, Al-Omran M, Hess DA. Concise Review: Cell Therapy for Critical Limb Ischemia: An Integrated Review of Preclinical and Clinical Studies. *Stem Cells.* 2018;36(2):161-71.
56. Buzhor E, Leshansky L, Blumenthal J, Barash H, Warshawsky D, Mazor Y, et al. Cell-based therapy approaches: the hope for incurable diseases. *Regen Med.* 2014;9(5):649-72.
57. Mount NM, Ward SJ, Kefalas P, Hyllner J. Cell-based therapy technology classifications and translational challenges. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2015;370(1680):20150017.
58. Wang AT, Feng Y, Jia HH, Zhao M, Yu H. Application of mesenchymal stem cell therapy for the treatment of osteoarthritis of the knee: A concise review. *World J Stem Cells.* 2019;11(4):222-35.
59. Andrzejewska A, Lukomska B, Janowski M. Concise Review: Mesenchymal Stem Cells: From Roots to Boost. *Stem Cells.* 2019;37(7):855-64.
60. Hashimoto Y, Nishida Y, Takahashi S, Nakamura H, Mera H, Kashiwa K, et al. Transplantation of autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells under arthroscopic surgery with microfracture versus microfracture alone for articular cartilage lesions in the knee: A multicenter prospective randomized control clinical trial. *Regen Ther.* 2019;11:106-13.
61. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2006;8(4):315-7.
62. Orozco L, Munar A, Soler R, Alberca M, Soler F, Huguet M, et al. Treatment of knee osteoarthritis with autologous mesenchymal stem cells: a pilot study. *Transplantation.* 2013;95(12):1535-41.

63. Davatchi F, Sadeghi Abdollahi B, Mohyeddin M, Nikbin B. Mesenchymal stem cell therapy for knee osteoarthritis: 5 years follow-up of three patients. *Int J Rheum Dis.* 2016;19(3):219-25.
64. Nasiri N, Hosseini S, Alini M, Khademhosseini A, Baghaban Eslaminejad M. Targeted Cell Delivery for Articular Cartilage Regeneration and Osteoarthritis Treatment. *Drug Discov Today.* 2019.
65. Robey P. "Mesenchymal stem cells": fact or fiction, and implications in their therapeutic use. *F1000 Faculty Rev.* 2017.
66. Perera JR, Jaiswal PK, Khan WS, Adesida A. Embryonic versus mesenchymal stem cells in cartilage repair. *J Stem Cells.* 2012;7(2):105-11.
67. Craft AM, Ahmed N, Rockel JS, Baht GS, Alman BA, Kandel RA, et al. Specification of chondrocytes and cartilage tissues from embryonic stem cells. *Development.* 2013;140(12):2597-610.
68. Wei Y, Zeng W, Wan R, Wang J, Zhou Q, Qiu S, et al. Chondrogenic differentiation of induced pluripotent stem cells from osteoarthritic chondrocytes in alginate matrix. *Eur Cell Mater.* 2012;23:1-12.
69. Yamashita A, Morioka M, Yahara Y, Okada M, Kobayashi T, Kuriyama S, et al. Generation of scaffoldless hyaline cartilaginous tissue from human iPSCs. *Stem Cell Reports.* 2015;4(3):404-18.
70. Chan CKF, Gulati GS, Sinha R, Tompkins JV, Lopez M, Carter AC, et al. Identification of the Human Skeletal Stem Cell. *Cell.* 2018;175(1):43-56.e21.
71. Zajdel A, Kałucka M, Kokoszka-Mikołaj E, Wilczok A. Osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells from adipose tissue and Wharton's jelly of the umbilical cord. *Acta Biochim Pol.* 2017;64(2):365-9.
72. Lyons FG, Mattei TA. Sources, Identification, and Clinical Implications of Heterogeneity in Human Umbilical Cord Stem Cells. *Adv Exp Med Biol.* 2019;1169:243-56.
73. Ledesma-Martínez E, Mendoza-Núñez VM, Santiago-Osorio E. Mesenchymal Stem Cells Derived from Dental Pulp: A Review. *Stem Cells Int.* 2016;2016:4709572.

74. Samsonraj RM, Raghunath M, Nurcombe V, Hui JH, van Wijnen AJ, Cool SM. Concise Review: Multifaceted Characterization of Human Mesenchymal Stem Cells for Use in Regenerative Medicine. *Stem Cells Transl Med.* 2017;6(12):2173-85.
75. Friedenstein AJ, Petrakova KV, Kurolesova AI, Frolova GP. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation.* 1968;6(2):230-47.
76. Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res.* 1991;9(5):641-50.
77. Beyer N, da Silva M. Mesenchymal stem cells: isolation, in vitro expansion and characterization.: *Handb Exp Pharmacol*; 2006. p. 249-82.
78. Shin TH, Lee S, Choi KR, Lee DY, Kim Y, Paik MJ, et al. Quality and freshness of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells decrease over time after trypsinization and storage in phosphate-buffered saline. *Sci Rep.* 2017;7(1):1106.
79. Chen AK, Reuveny S, Oh SK. Application of human mesenchymal and pluripotent stem cell microcarrier cultures in cellular therapy: achievements and future direction. *Biotechnol Adv.* 2013;31(7):1032-46.
80. Noronha NC, Mizukami A, Caliári-Oliveira C, Cominal JG, Rocha JLM, Covas DT, et al. Priming approaches to improve the efficacy of mesenchymal stromal cell-based therapies. *Stem Cell Res Ther.* 2019;10(1):131.
81. Tsuji K, Ojima M, Otabe K, Horie M, Koga H, Sekiya I, et al. Effects of Different Cell-Detaching Methods on the Viability and Cell Surface Antigen Expression of Synovial Mesenchymal Stem Cells. *Cell Transplant.* 2017;26(6):1089-102.
82. Ullah I, Subbarao RB, Rho GJ. Human mesenchymal stem cells - current trends and future prospective. *Biosci Rep.* 2015;35(2).
83. Bianco P. "Mesenchymal" stem cells. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2014;30:677-704.
84. Biotechnology — Biobanking — The establishment, maintenance, characterization and distribution requirements for pluripotent stem cells International Organization for Standardization2019 [1:[Available from: <https://www.iso.org/standard/79046.html?browse=tc>.

85. Zhao W, Ji X, Zhang F, Li L, Ma L. Embryonic stem cell markers. *Molecules*. 2012;17(6):6196-236.
86. Vazin T, Freed WJ. Human embryonic stem cells: derivation, culture, and differentiation: a review. *Restor Neurol Neurosci*. 2010;28(4):589-603.
87. Dittrich R, Beckmann MW, Würfel W. Non-embryo-destructive Extraction of Pluripotent Embryonic Stem Cells: Implications for Regenerative Medicine and Reproductive Medicine. *Geburtshilfe Frauenheilkd*. 2015;75(12):1239-42.
88. Cheng L, Hammond H, Ye Z, Zhan X, Dravid G. Human adult marrow cells support prolonged expansion of human embryonic stem cells in culture. *Stem Cells*. 2003;21(2):131-42.
89. Stojkovic P, Lako M, Stewart R, Przyborski S, Armstrong L, Evans J, et al. An autogeneic feeder cell system that efficiently supports growth of undifferentiated human embryonic stem cells. *Stem Cells*. 2005;23(3):306-14.
90. Bragança J, Lopes JA, Mendes-Silva L, Almeida Santos JM. Induced pluripotent stem cells, a giant leap for mankind therapeutic applications. *World J Stem Cells*. 2019;11(7):421-30.
91. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006;126(4):663-76.
92. Zhao J, Jiang WJ, Sun C, Hou CZ, Yang XM, Gao JG. Induced pluripotent stem cells: origins, applications, and future perspectives. *J Zhejiang Univ Sci B*. 2013;14(12):1059-69.
93. Xiong Y, Liu Y, Ge J. Induction of pluripotent stem cells by reprogramming human ocular fibroblasts under xeno-free conditions. *Arq Bras Oftalmol*. 2018;81(5):376-83.
94. Ponchio L, Duma L, Oliviero B, Gibelli N, Pedrazzoli P, Robustelli della Cuna G. Mitomycin C as an alternative to irradiation to inhibit the feeder layer growth in long-term culture assays. *Cytotherapy*. 2000;2(4):281-6.
95. Matoba N, Yamashita T, Takayama K, Sakurai F, Mizuguchi H. Optimal human iPS cell culture method for efficient hepatic differentiation. *Differentiation*. 2018;104:13-21.

96. D'Antonio M, Woodruff G, Nathanson JL, D'Antonio-Chronowska A, Arias A, Matsui H, et al. High-Throughput and Cost-Effective Characterization of Induced Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Reports*. 2017;8(4):1101-11.
97. Howden SE, Gore A, Li Z, Fung HL, Nisler BS, Nie J, et al. Genetic correction and analysis of induced pluripotent stem cells from a patient with gyrate atrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(16):6537-42.
98. Lancaster MA, Huch M. Disease modelling in human organoids. *Dis Model Mech*. 2019;12(7).
99. Lee D, Pathak S, Jeong JH. Design and manufacture of 3D cell culture plate for mass production of cell-spheroids. *Sci Rep*. 2019;9(1):13976.
100. Kim JA, Hong S, Rhee WJ. Microfluidic three-dimensional cell culture of stem cells for high-throughput analysis. *World J Stem Cells*. 2019;11(10):803-16.
101. Edmondson R, Broglie JJ, Adcock AF, Yang L. Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors. *Assay Drug Dev Technol*. 2014;12(4):207-18.
102. Xu H, Jiao Y, Qin S, Zhao W, Chu Q, Wu K. Organoid technology in disease modelling, drug development, personalized treatment and regeneration medicine. *Exp Hematol Oncol*. 2018;7:30.
103. McKee C, Chaudhry GR. Advances and challenges in stem cell culture. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2017;159:62-77.
104. Kratochvil MJ, Seymour AJ, Li TL, Paşca SP, Kuo CJ, Heilshorn SC. Engineered materials for organoid systems.
105. Wan Z, Zhang P, Liu Y, Lv L, Zhou Y. Four-dimensional bioprinting: Current developments and applications in bone tissue engineering. *Acta Biomater*. 2019.
106. Moroni L, Burdick JA, Highley C, Lee SJ, Morimoto Y, Takeuchi S, et al. Biofabrication strategies for 3D in vitro models and regenerative medicine. *Nat Rev Mater*. 2018;3(5):21-37.

107. Ong CS, Yesantharao P, Huang CY, Mattson G, Boktor J, Fukunishi T, et al. 3D bioprinting using stem cells. *Pediatric Research* volume. 2018;83:223–31.
108. Murphy SV, Atala A. 3D bioprinting of tissues and organs. *Nat Biotechnol.* 2014;32(8):773-85.
109. Mandrycky C, Wang Z, Kim K, Kim DH. 3D bioprinting for engineering complex tissues. *Biotechnol Adv.* 2016;34(4):422-34.