

Artículo de revisión

Tecnologías celulares e ingeniería tisular: Enfoque actual Tissue engineering and cellular technologies: current focus

Yury Lartsev¹

Resumen

La revisión propone una descripción general de la situación actual y reflexiones relacionadas con avances, dificultades y perspectivas del desarrollo de las tecnologías de cultivos y trasplantes celulares y su gran importancia para la salud pública como esperanza para el tratamiento de enfermedades graves, crónicas y degenerativas. La aplicación de tecnologías celulares en medicina es un campo prometedor y a la vez desafiante por su alta complejidad, y no solo requiere grandes inversiones en investigaciones científicas, equipamiento especializado y profesionales altamente calificados, sino también una legislación clara y regulación ética lo que la hace un asunto de importancia para cada país y para la sociedad mundial en general, debido a posibles especulaciones y daños que pueda causar su uso indiscriminado.

Palabras clave: Tecnologías celulares, trasplantes celulares, células madre mesenquimales, células diferenciadas, ingeniería tisular, cultivos celulares *in vitro*, matrices-portadores biológicas

Abstract:

This review proposes an overview of the current situation and reflections related to progress, problems and perspectives of development of the crop technologies and cell transplants and their importance to public health such as hope for the treatment of serious, chronic and degenerative diseases. The application of cell technologies in medicine is both a promising and a challenging field because of its high complexity, and it does not only require of large investments on scientific research, specialized equipment and highly qualified professionals, but also a clear legislation and ethic regulation, for this reason, and due to possible speculations and damages that could cause its indiscriminate use, it is an important issue for each country and the global society in general.

Key words: Cell technologies, cell transplants, mesenchymal stem cells, differentiated cells, tissue engineering, cell cultures *in vitro*, wombs - biological carriers

Introducción

En la actualidad el futuro de la medicina en muchos aspectos se relaciona con el desarrollo de las tecnologías celulares. Hoy en día es el área de biología con la mayor intensidad de desarrollo. Tecnologías celulares representan un conjunto de métodos y tecnologías que incluyen diferentes tipos de trasplantes de células, ingeniería tisular, genoterapia, terapia con citocinas, etc. Generalmente bajo el concepto “tecnologías celulares” se entiende solamente lo relacionado a células madre, pero estas últimas son solo una de las direcciones de la investigación científica en este campo.

La etapa científico-clínica moderna del desarrollo de las tecnologías celulares (trasplantología celular) tiene todavía poco tiempo. Sin embargo, estas tecnologías han superado el ambiente de los laboratorios de investigación y se están introduciendo en la práctica clínica cotidiana. La lista de enfermedades en cuyo tratamiento ya se están utilizando las tecnologías celulares o su aplicación se proyecta en el futuro próximo, crece rápidamente.

¹Unidad de trasplantes de células madre y diferenciadas en traumatología, Departamento de Ortopedia, Universidad Estatal Médica de Samara, Samara, Rusia. lartsev@mail.ru

Con su utilización se relacionan las grandes expectativas para el tratamiento de enfermedades crónicas graves como cardiológicas, endocrinológicas, oncológicas, neurológicas, hematológicas, traumatológicas y otras dolencias y patologías. Se considera que, si entendemos cómo manejar las células madre, conoceremos como derrotar el cáncer. Si aprendemos a cultivar en forma *in vitro* los órganos y tejidos (los trabajos respectivos como, por ejemplo, los experimentos de cultivo de las válvulas cardíacas en Rusia y otros países ya se están desarrollando) la medicina y cirugía regenerativa tendrá grandes posibilidades.

La necesidad del desarrollo de los métodos de la terapia celular se debe a múltiples factores: alto índice de discapacidad y mortalidad por causas de enfermedades crónicas no transmisibles en el mundo; gran déficit de donantes de órganos en todo el mundo; alto costo de trasplantes; alto riesgo de complicaciones relacionados con las intervenciones quirúrgicas masivas; serios problemas éticos y legales

Además se ha descubierto que los trasplantes celulares tiene una serie de ventajas en comparación con los trasplantes de órganos, como menor costo del método; mayor seguridad; accesibilidad de la mayor cantidad de personas; posibilidad de no utilizar los fármacos inmunosupresores o utilizar los de menor potencia y, como consecuencia, el menor costo y la menor cantidad de efectos adversos⁽¹⁾.

Sin embargo, nuevos datos de ensayos clínicos y seguimientos de los pacientes generan opiniones contradictorias y requieren un análisis más profundo^(2,3). Las expectativas de la sociedad que está deseando las curaciones mágicas de las enfermedades graves con el uso de las células madre todavía no se han cumplido. No todas las células madre traen felicidad: de algunas de ellas se desarrollan tumores malignos. Por lo tanto por el momento no podemos considerarlas como una panacea. Se están realizando los trabajos en el área de desarrollo de las tecnologías de aplicación de las células diferenciadas y otros campos de las tecnologías celulares.

Además, la aplicación de las tecnologías celulares se acompaña con serios problemas éticos y legales. Por un lado, las tecnologías de obtención y cultivo de las células *in vitro* permitirían dejar de usar a los animales en gran parte de experimentos, acercaría más los experimentos a los modelos humanos y harían los ensayos clínicos menos arriesgados para los pacientes. Por otro lado, la necesidad de implementación de tecnologías altamente especializadas con un alto costo de inversión en recursos materiales y humanos frena su rápida introducción en la práctica clínica y abre un amplio campo para el charlatanismo y abusos de los establecimientos médicos poco concienzudos. Cuando en los años 90 los periódicos en Rusia abundaban de artículos sobre las células madre, surgieron múltiples “expertos” en esta área. Cada laboratorio afirmaba que curaba con las células madre. Este agiotaje fue detenido con la prohibición de la propaganda indiscriminada. Asimismo, los aspectos éticos y legales son importantes para el desarrollo científico y planificación práctica oportuna en esta área.

Situación actual: avances, dificultades y expectativas

El término “célula madre” fue introducido en biología por un gran histólogo y embriólogo ruso, Alexander Alexandrowitsch Maximow (1874-1928), en el Congreso de Hematología de Berlín en 1908. El trabajo respectivo fue publicado en alemán en 1909⁽⁴⁾. Sin embargo, como el fundador de la terapia celular se considera el médico-emigrante ruso S. Vorontsov, quién en los años 20 y 30 en París intentaba trasplantar los tejidos fetales en caso de envejecimiento prematuro.

El estatus oficial esta área de biología ha recibido recién a finales del siglo XX. Solo en 1981 el genetista y bioquímico británico Martin John Evans logró extraer del embrioblasto de blastocisto de ratón las líneas no diferenciadas pluripotentes de las células madre^(5,6,7). En 1998 Thompson y Gerhart aislaron la línea inmortal de células madre embrionarias y en 1999 la revista *Science* reconoció el descubrimiento de las células madre embrionarias como el tercer acontecimiento más importante después de la decodificación de la doble hélice del ADN y del programa “Genoma Humano”.

En el desarrollo de las tecnologías celulares se puede distinguir dos enfoques diferentes de acuerdo a su base científico-metodológica. El primero está relacionado con la aplicación de las células diferenciadas de los organismos en crecimiento (humano y animal). El segundo consiste en la aplicación de células no diferenciadas (células madre) del ser humano⁽¹⁾. Actualmente se están desarrollando las tecnologías de aplicación de las células diferenciadas de origen autógeno extraídos y cultivados en condiciones *in vitro* especiales⁽⁸⁾.

La aplicación de las células diferenciadas de los organismos en crecimiento (embrionarias, fetales o de los organismos recién nacidos) apunta a corrección del desorden bioquímico celular reemplazando a los clones ausentes de células especializadas en los órganos, así como asegurando la participación de las células trasplantadas en la corrección de las funciones homeostáticas de las células conservadas del órgano dañado⁽¹⁾.

Técnicamente este método se aplica en dos formas: trasplante directo de las células de donantes en áreas determinadas (por ejemplo, colocación de neuronas con el apoyo de la técnica estereotaxica) o envío de las células con el flujo sanguíneo (introducción intraportal de las células pancreáticas)^(9,10,11).

La estabilidad, intensidad y duración del efecto clínico de este método depende de la cantidad de parénquima y de compatibilidad bioquímica del microambiente. El efecto positivo se mantiene los primeros 6-12 meses y después se reduce posiblemente por ausencia en el tejido adulto de los factores de crecimiento necesarios para el desarrollo de las células embrionarias, así como por las reacciones de rechazo contra antígenos de los embriones tardíos⁽¹⁾.

Como el recurso más apropiado para la ingeniería tisular se consideran las células madre mesenquimales o MSC (del inglés Mesenchymal Stem Cells o Mesenchymal Stromal Cells) extraídos de la médula ósea o del tejido adiposo. Células mesenquimales o estromales de la médula ósea poseen las propiedades de pluripotencia, es decir, dependiendo de las condiciones microambientales *in vitro* o *in vivo* (composición de los medios de cultivo, saturación de oxígeno, relaciones intercelulares, contactos de receptores con componentes del matriz extracelular, etc.) son capaces de diferenciarse en diferentes direcciones: fibroblástico, osteoblástico, condrocitario, adipocitario, etc.⁽¹²⁾. Debido a su capacidad para la diferenciación divergente, crecimiento clonogénico en el cultivo y por sus características morfo-funcionales, ellos fueron denominados como unidades formadoras de colonias de fibroblastos (UFCf, CFU-F - colony-forming unit-fibroblast)⁽¹³⁾. En literatura las UFCf se mencionan de diferente forma. Históricamente su nombre es “células madre estromales”⁽¹⁴⁾. Además, como sinónimo se utiliza el término “células madre mesenquimales”⁽¹⁵⁾. Actualmente como comúnmente aceptada se considera la denominación “células multipotentes mesenquimales estromales”^(16,17).

Inicialmente la posibilidad de trasplantes celulares se estudiaba para el tratamiento de diabetes mellitus tipo I y diferentes enfermedades degenerativas del SNC^(18,19,20,21). Posteriormente trataron de aplicar las biotecnologías celulares para el

tratamiento de las alteraciones isquémicas y traumáticas de diferentes órganos, para las enfermedades crónicas inflamatorias y algunas enfermedades sistémicas como oncológicas, aterosclerosis, distrofia muscular de Duchenne, enfermedad de Wilson, etc. El análisis de estos hallazgos está en los trabajos de diferentes autores^(10,22,23,24,25).

Se realizan los trabajos de investigación de la posibilidad de aplicación de las tecnologías celulares en enfermedades y alteraciones neurológicas, como la enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, alteraciones traumáticas de la médula espinal, alteraciones vasculares del SNC^(26,27,28,29). De manera notable, en experimentos con animales las células madre, trasplantadas en el encéfalo o médula espinal emigraban espontáneamente a las áreas dañadas y empezaban a generar las neuronas⁽³⁰⁾. Sin embargo, la accesibilidad a los tejidos fetales es limitada, su aplicación genera serios discrepancias éticas.

Otra área de la indagación científica es la estimulación de las propias células madre del encéfalo para proporcionar la "autoreparación". Una vez que se conozca más sobre las sustancias químicas que regulan la neurogénesis, será posible artificialmente incrementar su concentración en las estructuras del SNC donde se requiere el crecimiento del tejido nervioso⁽²⁷⁾. Se ha demostrado en experimentos en ratas que una sustancia en particular, la inosina, estimula a las fibras nerviosas no alteradas para desarrollar nuevas conexiones y restablecer la función motora después de las apoplejías⁽³¹⁾.

En la Universidad Estatal Médica de Samara (UEMS) funciona el Centro de Investigación de Tecnologías Celulares donde se desarrollan las nanobiotecnologías de cultivo de células madre y diferenciadas (fibroblastos, queratinocitos, condroblastos, cardiomiocitos, etc.) para tratamiento en cirugía, traumatología, ortopedia, otorrinolaringología, cardiología, urología, etc. En el presente trabajo se analizan los avances científicos-tecnológicos de cultivos celulares en ósteo- y condrogénesis.

En numerosas investigaciones se ha demostrado el potencial osteogénico y condrogénico de las células madre mesenquimales⁽³²⁾. En 1980 Ashton B.A. et al. presentó el estudio detallado de la ósteo- y condrogénesis con la participación de las células madre mesenquimales⁽³³⁾ y en 1998 Johnstone B. et al. determinó algunas de las condiciones que estimulan las manifestaciones de la condrogénesis en el microcultivo de las células madre de conejos. Estas condiciones resultaron ser el Factor de Crecimiento Transformante β (TGF- β) y la dexametasona⁽³⁴⁾. La agregación adicional en este cultivo celular de la Proteína Morfogénica Ósea (BMP), según Sekiya I. et al., aumentaba las manifestaciones de la condrogénesis⁽³⁵⁾. Durante aquellos años aparecieron trabajos que revelaban la posibilidad de diferenciación de las células madre mesenquimales humanas de la médula ósea en células con la expresión fenotípica característica para condrocitos⁽³⁶⁾. Sin embargo, la condrogénesis con la participación de las células madre mesenquimales *in vitro* no repetía exactamente la formación natural del tejido cartilaginoso durante el desarrollo del organismo. En microcultivos de las células madre mesenquimales se observaba el aumento de la expresión como del colágeno tipo II, tanto del colágeno tipo X. Cultivos celulares seguían sintetizando el colágeno tipo I^(37,38). Después de los trasplantes experimentales de cultivos de células madre mesenquimales en defectos de cartílago, el cartílago regenerado tenía menos espesor que el nativo. Zona límite con el cartílago en calcificación en el tejido regenerado no se recuperaba en su totalidad^(39,40).

Debido a lo que durante la multiplicación y diferenciación dirigida de las células madre mesenquimales *in vitro* inevitablemente se disminuye la viabilidad de las mismas, se realizaron los intentos utilizar para la regeneración de los defectos tisulares, en particular del cartílago articular, las células madre mesenquimales autológicas no

diferenciadas, pobladas en el implante beta-fosfato tricálcico, lo que generaba la recuperación completa de los defectos con la generación del cartílago hialinoforme. Lo mencionado fue estudiado en experimentos en ovejas.

Fue demostrada la posibilidad de expansión *in vitro* de las células madre mesenquimales autólogas de la médula ósea con su posterior trasplante en la articulación deteriorada de los pacientes con osteoartritis⁽⁴¹⁾. Para el tratamiento del defecto de la rótula se utilizaron las células madre mesenquimales autólogas, multiplicadas en el cultivo y colocadas en la matriz de colágeno (gel o placa). Observaron la completa sustitución del defecto con la formación de la superficie articular lisa. El cartílago generado no fue hialino sino fibroso⁽⁴²⁾.

Posteriormente se han obtenido buenos resultados de trasplantes de las células madre mesenquimales en articulaciones deterioradas de conejos^(42,43,44,45). Utilizando la matriz de Ácido Poliláctico-co-glicólico (PLGA) se logró obtener la completa recuperación de la superficie articular con la formación del cartílago hialino^(46,47).

Está demostrado que las células madre mesenquimales de la sangre de cordón umbilical en condiciones especiales son capaces de diferenciarse *in vitro* osteogénico- y condrogénicamente y propiciar la regeneración del tejido óseo y cartilaginoso *in vivo*⁽⁴⁸⁾. Células madre mesenquimales se detectan en la zona superficial del cartílago hialino articular, por lo tanto la hipótesis de su participación en la condrogénesis reparativa, así como de las células madre de otros tejidos, tiene unos fundamentos bastante sólidos^(49,50).

Asimismo, las células madre forman colonias similares y manifiestan *in vitro* el potencial condrogénico, osteogénico y adipogénico^(51,52,53,54). Nivel del potencial condrogénico de las células madre mesenquimales de la médula ósea, membrana sinovial, periostio, músculos, tejido adiposo se diferencia considerablemente. Según los resultados de la mayoría de las investigaciones este ha sido más alto en cultivos de las células madre mesenquimales obtenidos de la médula ósea y membrana sinovial^(55,56). La condrogénesis en cultivos de las células madre mesenquimales de la membrana sinovial, según Sakaguchi Y. et al., fue incluso más alto que en cultivos de las células madre de la médula ósea como en animales experimentales, tanto en humanos⁽⁵⁷⁾. Koga H. et al. constató la mejor regeneración de los defectos cartilaginosos en conejos después de trasplante de las células madre mesenquimales, aisladas de la membrana sinovial o médula ósea⁽⁵⁸⁾. (Figura 1).

La comparación de las ventajas y desventajas de las células madre mesenquimales de la membrana sinovial y de la médula ósea revela que el cultivo celular de la membrana sinovial en el medio de cultivo en base del suero humano autógeno crece más rápido que el cultivo de la médula ósea. Sin embargo, la extracción de las células madre mesenquimales de la médula ósea en actualidad es una manipulación más sencilla que de la membrana sinovial y, probablemente, este argumento se considera como el más significativo^(58,59).

El procedimiento más común de la extracción de las células madre mesenquimales es el procesamiento de la médula ósea. La médula ósea se obtiene mediante la punción de la crista iliaca con agujas especiales en cantidad de 100-200 ml. Después de aspiración la médula ósea se filtra y se coloca en el contenedor de plástico estéril (con 100 ml de albumina humano, 25,000 unidades de heparina). Luego con el apoyo de equipos especiales se realiza la separación de las células por tamaño, densidad o reactividad inmunológica (basada en anticuerpos monoclonales contra el antígeno CD133+).

El cultivo de las células madre mesenquimales para su posterior uso con fines científicos y prácticos se realiza en el plasma de los terneros recién nacidos. En el momento de trasplantar este cultivo siempre existe riesgo de la transmisión de diferentes enfermedades y reacciones inmunológicas de rechazo^(60,61). Se están estudiando las posibilidades de la aplicación alternativa del plasma autógeno para el cultivo de las células madre mesenquimales.

El verdadero reto para la ingeniería tisular es el desarrollo de las matrices-bioportadores para la colocación direccionada de las células a trasplantar en el lugar de alteración y creación de la carcasa necesaria para la adhesión y proliferación celular^(62,63). Durante el cultivo *in vitro* las células madre mesenquimales se introducen en el biomaterial y conjuntamente con el siguen su multiplicación y desarrollo.

Los biomateriales deben cumplir, por un lado, el rol de matriz o portador de células, y, por el otro lado, influir adecuadamente en la diferenciación de las mismas. En caso de defectos cartilagosos la adecuada matriz con las células de una manera significativa facilita la intervención quirúrgica, en el cual el complejo células-matriz se introduce directamente en el defecto del cartílago sin fijación adicional con el periostio. En caso de una buena adhesión de trasplante con el hueso subcondral su fijación adicional no se requiere⁽⁶⁴⁾.

Como biomateriales se utilizan el ácido hialurónico, colágeno y polímeros (PLA, PGA, PLLA, PLDLA). Existen datos sobre el uso de los materiales-carcasas sintéticos que se degradan por los microorganismos. Las matrices al asegurar una buena estructura inicial pueden temporalmente estabilizar los condrocitos en el defecto y dirigir su distribución espacial dentro del tejido, así como la síntesis del colágeno y proteoglicanos. En modificaciones posteriores de esta técnica empezaron a utilizar el gel de colágeno, en el cual las células aisladas sin el cultivo se introducen directamente en el cultivo en forma de monocapa. Condrocitos de la suspensión tienen la capacidad de introducirse de la matriz-portador en los tejidos circunstantes del receptor con su posible posterior integración completa. Es muy importante que la introducción de este tipo de matriz artificial puede realizarse por el método poco invasivo como la artroscopía^(65,66).

Cierto interés genera el uso en calidad de bioportadores de los autocondrocitos alginatos. Ellos son polisacáridos aniónicos de las paredes celulares de las algas marinas pardas, que contienen copolímeros lineales de manuronato-guluronato y se caracterizan por la composición específica. Uno de aplicaciones originales de los alginatos ha sido la estimulación de fenotipo de los condrocitos y aumento de su funcionamiento en el cultivo *in vitro*⁽⁴⁴⁾.

En general, para las matrices-portadores de las células madre mesenquimales se presentan siguientes requisitos: El material no puede tener efecto negativo contra las células; además de propiedades conductivas tiene que poseer las propiedades inductivas; fomentar la viabilidad, actividad proliferativa y diferenciación respectiva de las células después de trasplante; tiene que someterse a bioresorción, liberando el espacio para el tejido que se está formando y dándole el material necesario para su formación⁽⁶⁷⁾.

Se ha obtenido buenos resultados el uso en calidad del bioportador la esponjosa alogénica desmineralizada, "Lioplast", obtenida en el banco de tejidos de la UEMS según el método original patentado de la sustancia esponjosa de las epífisis de huesos largos de conejos adultos.

El proceso de obtención del dicho bioportador incluye el tratamiento especial de los tejidos por ultrasonido para eliminar los elementos de la médula ósea y grasa de la

spongiosa, esterilización primaria del material, inactivación viral. Luego del tratamiento primario liofilizan los tejidos, empaquetan herméticamente y esterilizan con radiación.

Grandes expectativas generan los avances en posibilidad de cultivos y trasplantes de las células en diferentes etapas de diferenciación (fibroblastos, queratinocitos, condroblastos, cardiomiocitos, etc.) cuya aplicación está libre del riesgo de malignización o este riesgo se ve significativamente reducido. Por lo tanto el trabajo con las células e ingeniería tisular se debe realizar con mucha exactitud y responsabilidad.

Actualmente los resultados de las investigaciones experimentales en esta área no son definitivos, requieren múltiples investigaciones y análisis. No está bien resuelta la parte ética del asunto. Debido a esto varios países han prohibido el uso de tecnologías celulares en la práctica clínica. En Rusia, la investigación esta bajo el control de las autoridades respectivas.

Conclusiones

La medicina actual ya ha iniciado la aplicación de tecnologías celulares para el tratamiento de diferentes enfermedades que en su esencia representan el comportamiento anómalo de diferentes poblaciones celulares en el organismo y que pueden ser corregidas con los factores de las células jóvenes y sanas.

El principal obstáculo en el camino de introducción de estas tecnologías en la práctica clínica son 2 factores: déficit de material donante auto- y alógeno con la actividad expresa; y ausencia de las pruebas consistentes de los efectos clínicos pronunciados y prolongados en pacientes con enfermedades sistémicas y autoinmunes crónicas, que dependen de tales resultados.

El cultivo celular de células madre mesenquimales estromales tiene los problemas del alto costo y de la imprevisibilidad de la diferenciación.

La aplicación de tecnologías celulares en medicina no solo requiere grandes inversiones, equipamiento de punta y especialistas altamente calificados, sino también una legislación clara y regulación.

Se debe elaborar un sistema racional de aplicación de tecnologías celulares en pacientes con diferentes patologías, determinación de indicaciones y contraindicaciones.

Referencias bibliográficas

1. Onischenko N. Tecnologías celulares y medicina moderna. Fisiología patológica y terapia experimental (Moscú). 2004; 4: 2-11.
2. Deev R. Particularidades de osteogénesis fisiológico y reparativo después de trasfusión de las células de la médula espinal con núcleos. Trasplantología celular e ingeniería tisular (Moscú). 2006; 3(5): 54-8.
3. Tumanov V. Tecnologías celulares modernas. Novedades de la citología clínica de Rusia (Vorónezh). 2007; 11 (3): 34-8.
4. Der Lymphozyt als gemeinsame Stammzelle der verschiedenen Blutelemente in der embryonalen Entwicklung und im postfetalen Leben der Säugetiere. Folia Haematologica (Leipzig, Klinghardt). 1909; 8: 125-34.
5. Deutschman T, Eistetter H, Katz M, et al. The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines. Embryol Exptl Morphol. 1985; 87: 27-45.
6. Evans M, Kaufman M. Establishment in culture of pluripotent cells from mouse embryos. Nature (Lond.). 1981; 292: 154-6.

7. Martin G. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1981; 78: 7634-8.
8. Lartsev Y. Tecnologías celulares en la Universidad Estatal Médica de Samara (UEMS), Rusia. *Revista del Instituto Peruano de Ortopedia y Traumatología*. 2011; 1(2): 24-6.
9. Onischenko N, Bazieva F, Ivanova-Smolenskaya I, et al. *Boletín de trasplantología y órganos artificiales (Moscú)*. 1999; 1: 54-9.
10. Shumakov V. *Ensayos en problemas fisiológicos de trasplantología y aplicación de órganos artificiales*. Tula, Rusia: Repronix; 1998.
11. Demetriou A, Rozga J, Podesta L. et al. *Scand J. Gastroenterol*. 1995, 30, Suppl 208: 111-7.
12. Peister A. Adult stem cells from bone marrow (MSCs) isolated from different strains of inbred mice vary in surface epitopes, rates of proliferation, and differentiation potential. *Blood*. 2004; 103 (5): 1662-8.
13. Fridenshtein A. Células madre osteogénicas de la médula espinal. *Ontogénesis*. 1991; 2: 189-97.
14. Owen M. Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors. *Cell and molecular biology of vertebrate hard tissues*. En: *Proceedings of a symposium held at the Ciba Foundation*. London; 1988. p. 42-53.
15. Wakitani S, Goto T, Pineda S. et al. Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage. *J. Bone Joint Surg. (Am.)*. 1994; 76: 579-92.
16. Malanin D, Pisarev V, Novochadov V. *Reconstrucción de las alteraciones del cartílago articular de rodilla*. Volgogrado (Rusia): Editorial científico del Volgogrado; 2010.
17. Horwitz E. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2005; 7(5): 393-5.
18. Otellin V. Sustento morfológico de aplicación de neurotrasplantología en la práctica clínica. *Asuntos de neurocirugía*. 1999; 4: 32-7.
19. Ugrumov M. Neurotrasplantología experimental y clínica, situación actual y perspectivas. *Ciencia de longevidad*. 2001; 1: 9-17.
20. Shumakov V, Blumkin V, Skaletskiy N. *Trasplante de las células pancreáticas insulares*. Moscú: Kanon; 1995.
21. Lafferty K. Diabetes. *Nutr. Metab*. 1989; 2: 323-32.
22. Berseniev A, Krasheninnikov M, Onischenko N. *Boletín de trasplantología y órganos artificiales (Moscú)*. 2001; 2: 46-53.
23. Viktorov I, Sukhih G. Aspectos médico-biológicos de la aplicación de las células madre. *Boletín de la Academia de Ciencias Médicas de Rusia*. 2002; 4: 24-30.
24. Potapov I, Krasheninnikov M, Onischenko N. *Boletín de trasplantología y órganos artificiales (Moscú)*. 2001; 2: 54-62.
25. Repin V, Sukhih G. *Biología celular médica*. Moscú: BEByM; 1998.
26. Barinaga M. Asilomar revisited: lessons for today. *Science*. 2000; 287: 1584-5.
27. Gage F. Mammalian neural stem cells. *Science*. 2000; 287: 1433-8.
28. McMillan T, Robertson I, Wilson B. Neurogénesis after brain injury: implications for neurorehabilitation. *Neuropsychological Rehabilitation*. 1999; 9: 129-33.
29. Van Praag H, Gage F. Stem cell research, part 1: New neurons in the adult brain. *Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry*. 2002; 41: 354-6.
30. McKay R. Stem cells in the nervous system. *Science*. 1997; 276: 66-71.
31. Chen P, Goldberg D, Kolb B, Lanser M, Benowitz L. Inosine induces axonal rewiring and improves behavioral outcome after stroke. *Proceeding of the National Academy of Science USA*. 2002; 99: 9031-6.

32. Dragoo J, Choi J, Lieberman J, Huang J, Zuk P, Zhang J, et al. Bone induction by BMP-2 transduced stem cells derived from human fat. *J Orthop Res.* 2003 Jul; 21(4):622-9.
33. Ashton B, Allen T, Howlett C, et al. Formation of bone and cartilage by marrow stromal cells in diffusion chambers in vivo. *Clin. Orthop.* 1980; 151: 294-307.
34. Johnstone B, Hering T, Caplan A, et al. In vitro chondrogenesis of bone marrow derived mesenchymal progenitor cells. *Exp. Cell. Res.* 1998; 238: 265-72.
35. Sekiya I, Larson B, Smith J, et al. Expansion of human adult stem cells from bone marrow stroma: conditions that maximize the yields of early progenitors and evaluate their quality. *Stem. Cells.* 2002; 20: 530-41.
36. Yang W, Gomes R, Brown A, et al. Chondrogenic differentiation on perlecan domain I, collagen II, and bone morphogenetic protein-2-based matrices. *Tissue Eng.* 2006; 12: 2009-2024.
37. Ichinose S, Yamagata K, Sekiya I, et al. Detailed examination of cartilage formation and endochondral ossification using human mesenchymal stem cells. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 2005; 32: 561-70.
38. Steck E, Bertram H, Abel R, et al. Induction of intervertebral disc-like cells from adult mesenchymal stem cells. *Stem. Cells.* 2005; 23: 403-11.
39. Berseniev A. Trasplantaología celular. Historia, situación actual y perspectivas. *Trasplantaología celular e ingeniería tisular.* 2005; 1: 49-56.
40. Koga H, Muneta T, Ju Y, et al. Synovial stem cells are regionally specified according to local microenvironments after implantation for cartilage regeneration. *Stem. Cells.* 2007; 25: 689-96.
41. Wakitani S. Human autologous culture expanded bone marrow mesenchymal cell transplantation for repair of cartilage defects in osteoarthritic knees. *Osteoarthritis Cartilage.* 2002; 10(3): 199-206.
42. Wakitani S. Autologous bone marrow stromal cell transplantation for repair of full-thickness articular cartilage defects in human patellae: two case reports. *Cell. Transplant.* 2004; 13 (5): 595-600.
43. Ponticciello M. Gelatin-based resorbable sponge as a carrier matrix for human mesenchymal stem cells in cartilage regeneration therapy. *J. Biomed. Mater. Res.* 2000; 52(2): 246-55.
44. Diduch D. Marrow stromal cells embedded in alginate for repair of osteochondral defects. *Arthroscopy.* 2000; 16 (6): 571-7.
45. Ahn J, Terry S, Butler S, Hasty K. Stem cell repair of physal cartilage. *J Orthop Res.* 2004 Nov; 22(6): 1215-21.
46. Uchio Y. Cartilage regeneration using mesenchymal stem cells and a three-dimensional poly-lactic-glycolic acid (PLGA) scaffold. *Biomaterials.* 2006; 20: 4273-9.
47. Pelttari K, Winter A, Steck E, et al. Premature induction of hypertropil during in vitro chondrogenesis of human mesenchymal cells correlates with calcification and vascular invasion an ectopic transplantation in SCID mice. *Arthritis Rheum.* 2006; 54: 3231-66.
48. Jager M, Sager M, Knipper A, Degistirici O, Fischer J, Kogler G, Wernet P, Krauspe R. In vivo and in vitro bone regeneration from cord blood derived mesenchymal stem cells. *Orthopade.* 2004 Dec; 33(12): 1361-72.
49. Alsalameh S, Amin R, Gemba T, et al. Identification of mesenchymal progenitor cells in normal and osteoarthritic human articular cartilage. *Arthritis Rheum.* 2004; 50: 1522-32.
50. Douthwaite G, Bishop J, Redman S, et al. The surface of articular cartilage contains a progenitor cell population. *J. Cell Sci.* 2004; 117: 889-97.

51. Gornostaev V, Kuliaba T, Kornilov N, et al. Características de cultivo de las células madre mesenquimales del tejido adiposo de la articulación de rodilla utilizadas para la condroplastía. En VIII Congreso de la Sociedad de Artroscopía de Rusia. Moscú; 2009. p. 30.
52. De Ugarte D, Morizono K, Elbarbary A, et al. Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow. *Cells Tissues Organs*. 2003; 174: 101-9.
53. Lin Y, Luo E, Chen X, et al. Molecular and cellular characterization during chondrogenic differentiation of adipose tissue-derived stromal cells in vitro and cartilage formation in vitro. *J. Cell Mol. Med*. 2005; 9 (4): 929-39.
54. Shirasawa S, Sekiya I, Sakauchi Y, et al. In vitro chondrogenesis of human synovium-derived mesenchymal stem cells: optimal condition and comparison with bone marrow-derived cells. *J. Cell Biochem*. 2006; 97 (1): 84-97.
55. Huang J, Kazmi N, Durbhakula M, et al. Chondrogenic potential of progenitor cells derived from human bone marrow and adipose tissue: a patient-matched comparison. *J. Orthop. Res*. 2005; 23: 1383-9.
56. Miyamoto A, Deie M, Yamasaki T, et al. The role of the synovium in repairing cartilage defects. *Knee Surg. Sports. Traumatol. Arthrosc*. 2007; 15: 1083-93.
57. Sakaguchi Y, Sekiya I, Yagishita K, et al. Comparison of human stem cells derived from various mesenchymal tissues: superiority of synovium as a cell source // *Arthritis Rheum*. – 2005. – 52. – P. 2521-2529.
58. Koga H, Muneta T, Nagase T, et al. Comparison of mesenchymal tissues-derived stem cells for in vivo chondrogenesis: suitable conditions for cell therapy of cartilage defects in rabbit. *Cell Tissue Res*. 2008; 333: 207-15.
59. Nimura A, Muneta T, Koga H, et al. Increased proliferation of human synovial mesenchymal stem cells with autologous human serum: comparisons with bone marrow mesenchymal stem cells and with fetal bovine serum. *Arthritis Rheum*. 2008; 58: 501-10.
60. Mackensen A, Drager R, Schlesier M, et al. Presence of IgE antibodies to bovine serum albumin in a patient developing anaphylaxis after vaccination with human peptide-pulsed dendritic cells. *Cancer Immunol. Immunother*. 2000; 49: 152-6.
61. Horwitz E. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2005; 7(5): 393-5.
62. Tikhilov R. Cuarenta años de experiencia del banco de tejidos del Instituto de Investigación Científica de Traumatología y Ortopedia de Rusia "R.R.Vreden" en preparación de trasplantes y abastecimiento de los establecimientos de salud. En: Libro de ponencias: VIII Congreso de traumatología y ortopedia de Rusia. Samara; 2006. p. 110-1.
63. Kotelnikov G. Aplicación del trasplante celular-tisular combinado para el tratamiento de enfermedades destructivo-distróficas de la articulación de rodilla. En: Materiales del XVIII Congreso Internacional de la Asociación Europea de los Bancos de Células. Cracovia; 2009. p. 24.
64. Erggelet C. The operative treatment of full thickness cartilage defects in the knee joint with autologous chondrocyte transplantation. *Saudi Med J*. 2005; 8: 715-21.
65. Lee C, Grodzinsky A, Hsu H, Spector M. Effects of a cultured autologous chondrocyte-seeded type II collagen scaffold on the healing of a chondral defect in a canine model. *J Orthop Res*. 2003 Mar; 21(2): 272-81.
66. Lendeckel, S. Autologous stem cells [adipose] and fibrin glue used to treat widespread traumatic calvarial defects: case report. *J. Cranio-Maxillofac. Surg*. 2004; 32(6): 370-3.
67. Kotelnikov G. Aplicación de nanobioportador alógeno tridimensional en el trasplante celular-tisular combinado para la condroplastía en conejos. En: Materiales del XIX Congreso Internacional de la Asociación Europea de los Bancos de Células. Berlín; 2010. p. 46.