



UNIVERSITAT DE BARCELONA

Utilización de células madre adiposas en procesos de regeneración ósea guiada en defectos de tamaño crítico de la cortical vestibular

Joaquín Alvira González

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

*Utilización de células madre adiposas en procesos de regeneración ósea y
defectos de tamaño crítico de la cortical vestibular.*

Utilización de células madre adiposas en procesos de regeneración ósea guiada en defectos de tamaño crítico de la cortical vestibular.

5. DISCUSIÓN.

Utilización de células madre adiposas en procesos de regeneración ósea guiada en defectos de tamaño crítico de la cortical vestibular.

5. DISCUSIÓN

5.1. Justificación de la metodología científica empleada y principales limitaciones de los estudios presentados

La utilización de células madre en los procedimientos de ingeniería tisular ha demostrado ser una técnica predecible con resultados prometedores, especialmente en la reconstrucción de defectos óseos críticos de los maxilares (5,6,51,107). El descubrimiento de fuentes de células madre alternativas a las procedentes de la médula ósea, como las del tejido adiposo, ha obligado a determinar sus posibles aplicaciones mediante modelos experimentales. La principal limitación de nuestros estudios está en la dificultad de comparar los resultados obtenidos con otras publicaciones, a pesar de haber seguido la guía ARRIVE para garantizar la reproducibilidad en estudios experimentales (108,109). Esto es debido a la escasez de estudios publicados y a la heterogeneidad de los modelos utilizados hasta el momento con células madre adiposas en técnicas regenerativas de defectos óseos. Delgado-Ruiz y cols.(108) llegan a la misma conclusión en una revisión sistemática en la que analizan los estudios publicados sobre regeneración ósea en defectos críticos en calota de conejo, encontrando limitaciones principalmente respecto a la falta de homogeneidad en la definición de los defectos críticos y en las técnicas de análisis histomorfométrico utilizadas.

La selección de perros para esta línea de investigación se debe a la estandarización de este animal de experimentación en el estudio del tratamiento de defectos de tipo dehiscencia asociados a la colocación de implantes, tal y como lo demuestran diversas publicaciones (40,44–46,109). Los defectos de tipo dehiscencia se caracterizan por la afectación de la

Utilización de células madre adiposas en procesos de regeneración ósea guiada en defectos de tamaño crítico de la cortical vestibular.

cortical vestibular reduciendo el reborde óseo alveolar disponible en sentido horizontal pero sin compromiso del componente vertical. Diversos estudios de RO asociada a implantes han utilizado este tipo de defecto óseo, ya que se considera un defecto crítico con una elevada prevalencia en la práctica diaria implantológica, que resulta fácilmente reproducible y útil para su comparación interindividuo e intraindividuo (40,44–46).

En la actualidad se adopta la definición de defecto crítico propuesta por Cooper y cols.(110), en la que lo describe como el defecto de tamaño más pequeño que no es capaz de regenerarse espontáneamente cuando se deja sin tratar durante un cierto período de tiempo. Esta definición podría generar controversia si se asocia a defectos del tipo dehiscencia, especialmente si atendemos a su tamaño y al grado de compromiso del implante, ya que algunos autores sugieren que los defectos de tipo dehiscencia tendrían una cierta capacidad de regeneración espontánea pudiendo sesgar el verdadero potencial de las técnicas y biomateriales estudiados (111,112).

Con el objetivo de cumplir las bases fundamentales de cualquier estudio en un modelo animal, ambos trabajos de experimentación se llevaron a cabo de forma paralela y simultáneamente en la misma muestra para cumplir las directrices de “la triple R” (reemplazar, refinar y reducir) de Russell y Burch, como imperativo ético para garantizar un uso racional y de calidad en investigación con animales de experimentación, evitando además la posibilidad de crear un sesgo en los resultados (113,114).

La utilización de perros como animal de experimentación tiene algunas desventajas, tal y como se observó durante el postoperatorio y en el análisis histomorfométrico, a pesar del proceso de refinamiento llevado a cabo en un perro piloto previo a los estudios presentados. La aparición de

Utilización de células madre adiposas en procesos de regeneración ósea guiada en defectos de tamaño crítico de la cortical vestibular.

dehiscencias en algunas heridas así como la contaminación de los defectos control con biomaterial particulado procedente de los defectos vecinos pudo alterar parte de los resultados. Khoshzaban y cols.(115) asocian esta contaminación a las maniobras en el momento de la sutura de la incisión así como por los propios movimientos del animal, pudiendo representar un sesgo importante en los resultados registrados. Asimismo, la falta de estabilización de la membrana sobre los defectos mediante algún sistema de fijación, pudo comprometer la cantidad de área regenerada así como favorecer el desplazamiento del biomaterial (116,117). Mir y cols. (116) concluyen que la utilización de chinchetas para fijar la membrana de colágeno mantiene de forma estable el biomaterial particulado colocado en el área de regeneración de defectos de tipo dehiscencia asociados a la colocación simultánea de implantes, con resultados equivalentes a los observados al utilizar un sustituto óseo en forma de bloque.

Otro factor a tener en cuenta en nuestros trabajos es el biomaterial utilizado como estructura de soporte y la biomolécula de recubrimiento. En la actualidad no existe consenso respecto al tipo de andamio/carrier o el tipo de biomoléculas de elección en procedimientos de regeneración de defectos óseos como sustitutos del hueso autólogo, a pesar de que los resultados obtenidos en procedimientos de ingeniería tisular son satisfactorios con diversas combinaciones (49). La matriz extracelular del tejido óseo presenta un tamaño y una forma de poro variable, así como una distribución aleatoria difícilmente adquirida en los biomateriales, independientemente del origen. Además, a pesar de que las biomoléculas y los factores de crecimiento que intervienen en cada una de las fases de la RO están descritas de forma precisa, su función estaría supeditada a unas cantidades mínimas que variarían de acuerdo a la localización anatómica, siendo difícil calibrar con exactitud su potencial osteoinductor (51).

Utilización de células madre adiposas en procesos de regeneración ósea guiada en defectos de tamaño crítico de la cortical vestibular.

La ausencia de un grupo tratado únicamente por un biomaterial recubierto con células madre adiposas (β -TCP-ADSCs) representa otra posible limitación de ambos estudios. Sin embargo, la eficacia demostrada por las ADSCs en procesos de regeneración ósea (82,118–120), así como las dificultades técnicas para poder generar y distribuir todos los defectos en el espacio disponible en una hemimandíbula, limitó el número de grupos estudio. Los grupos seleccionados fueron los que se consideraron de interés debido a la falta de estudios previos en un modelo *in vivo* experimental.

Utilización de células madre adiposas en procesos de regeneración ósea guiada en defectos de tamaño crítico de la cortical vestibular.

5.2. *El papel de las células madre en procesos de regeneración ósea: Las células madre adiposas frente a las células madre de médula ósea y otros sustitutos óseos.*

Los procedimientos de ingeniería tisular basados en la utilización de células madre de médula ósea se han aplicado con éxito en diferentes técnicas de RO de los maxilares (85,96,97,121). Diversos autores concluyen que las células madre medulares en combinación con una matriz de soporte obtienen los mejores resultados (96,98,122,123), registrando índices de formación ósea muy similares a los obtenidos injertando únicamente hueso autólogo (98,124).

La utilización de células madre procedentes del tejido adiposo en los procedimientos de RO surge como alternativa al uso de las procedentes de la médula ósea, principal exponente en el campo de la ingeniería tisular, con el objetivo de disminuir la morbilidad de la zona donante, así como de obtener un elevado número de células, limitaciones asociadas a los procesos de aspiración medular (75,88,118).

A pesar de que diversos estudios ponen de manifiesto las similitudes entre las células madre de ambas procedencias respecto al fenotipo y origen embriológico (70,82,118,125), otros autores insisten en la menor capacidad de diferenciación hacia osteoblastos de las procedentes del tejido adiposo, lo que puede ser una limitación en la RO (88,126,127). Han y cols. (71), sin embargo, demuestran que a pesar de que la tasa de diferenciación de células madre adiposas en osteoblastos es menor, la cantidad de hueso regenerado es similar al de las células procedentes de la médula ósea en el mismo periodo de tiempo. Asimismo, Stockmann y cols.(128) y Kang y cols.(129) no sólo registran unos resultados similares en cuanto a la tasa de formación ósea al comparar ambos tipos de células madre, sino que

también son similares a los obtenidos con células madre procedentes del periostio o bien del cordón umbilical.

Considerando los resultados presentados por estos autores (71,128,129), parece evidente que la capacidad osteogénica de las células madre de origen adiposo es equiparable a la de las procedentes de la médula ósea, a pesar de las posibles limitaciones. No obstante, en nuestro caso no es posible la comparación de forma rigurosa de los resultados referentes a los índices de formación ósea con los obtenidos por otros autores al utilizar células madre procedentes de médula ósea. Esto es debido a la dificultad de extrapolar nuestros datos con los registrados en otros modelos de experimentación en los que no se ha utilizado la misma metodología.

La intervención de otros factores, además de la capacidad de diferenciación de las propias células madre, explicaría las similitudes en los resultados obtenidos en diferentes estudios histomorfométricos al comparar ambos tipos de precursores celulares (medula ósea y tejido adiposo) en técnicas de RO. Diversos autores sugieren que la regeneración ósea se desencadena a través de dos procesos de forma paralela y simultánea: la regeneración ósea directa y la indirecta (69,71,72). En la vía directa es el potencial de diferenciación de las células madre hacia células osteoinductoras (osteoblastos) y la expresión de fosfatasa alcalina (las células madre adiposas expresan menos fosfatasa alcalina que las células madre procedentes de la médula ósea) lo que llevaría a cabo el proceso de formación ósea. Por su parte, en la vía indirecta intervendrían factores secundarios (mediadores) inducidos por las células madre, precipitando la cascada de fenómenos que darían lugar a la formación del tejido óseo. Entre estos factores destaca la síntesis de colágeno tipo I, el efecto de la osteocalcina en la matriz sintetizada por las células madre, así como la expresión de diversos factores crecimiento y proteínas específicas como la

Utilización de células madre adiposas en procesos de regeneración ósea guiada en defectos de tamaño crítico de la cortical vestibular.

osteopontina y las BMP (principalmente la BMP-II) (71). Por este motivo, para poder determinar la verdadera capacidad osteogénica de las células madre, independientemente de su origen, es necesario realizar más estudios considerando todos los posibles factores que estarían involucrados en los procesos de RO.

La capacidad de las células madre procedentes de tejido adiposo de inducir la formación de tejido óseo las convierte sin lugar a dudas en una buena alternativa al hueso autólogo en los procedimientos de RO de defectos maxilares (82,118,119,126). No obstante, la capacidad osteoformadora de este tipo de células madre no parece ser mayor frente al hueso autólogo u otros sustitutos óseos en las mismas condiciones (87,130,131), característica también observada en nuestros resultados. El recubrimiento de un biomaterial con células madre adiposas y fibronectina (β -TCP-Fn-ADSCs) no supuso un mayor grado de formación ósea frente a otros tipos de biomateriales particulados (β -TCP o β -TCP-Fn) o al defecto control en cada uno de los tres tiempos analizados en ambos estudios experimentales, a pesar de que la fibronectina aumenta la adhesión de las células madre a las partículas de material fosfocálcico.

Diversos autores se encuentran en la misma situación al comparar el potencial osteogénico de las células madre adiposas frente a otros sustitutos óseos. Pourebrahim y cols. (130) obtuvieron una menor tasa de formación de tejido óseo al comparar los resultados del tratamiento de fisuras alveolares creadas en el maxilar superior de perros entre un biomaterial bifásico de hidroxiapatita/ β -fostato tricálcico recubierto con células madre adiposas respecto al hueso autólogo. Bohnenblust y cols. (131), por su parte, concluyen que la presencia de células madre adiposas en defectos críticos de calota de rata no incrementa la densidad ósea frente a la utilización únicamente de un aloinjerto. Han y cols. (87) en defectos

Utilización de células madre adiposas en procesos de regeneración ósea guiada en defectos de tamaño crítico de la cortical vestibular.

críticos de calota de conejo, tampoco encontraron diferencias en el grado de formación ósea entre defectos tratados con células madre adiposas, defectos regenerados con una matriz de hueso desmineralizado o bien una combinación de ambos.

Las semejanzas en la metodología empleada en nuestros estudios permite la comparación de los resultados observados conjuntamente, mostrando unos índices de formación ósea satisfactorios tanto de forma previa como simultánea a la colocación de implantes utilizando un biomaterial osteoconductor con diferentes tipos de recubrimiento. No obstante, es importante destacar que los porcentajes de tejido óseo neoformado en cada uno de los estudios presentados no siguieron la misma evolución a lo largo del tiempo. En el segundo estudio no se observaron diferencias entre los tres tiempos, independientemente del tipo de defecto analizado (control, β -TCP, β -TCP-Fn o β -TCP-Fn-ADSCs), en comparación con los datos observados en el primer estudio, donde todos los defectos presentaron un incremento significativo de la matriz ósea neoformada conforme aumentaba el periodo de cicatrización. Sin embargo, este proceso no tuvo lugar siguiendo un patrón uniforme en todos ellos. Mientras que en los defectos control el crecimiento significativo tuvo lugar en el segundo mes del postoperatorio, el incremento en los defectos con β -TCP o bien los que contenían β -TCP-Fn-ADSCs fue significativo al tercer mes de cicatrización. Tan sólo los defectos tratados con β -TCP-Fn mostraron un incremento progresivo lineal a lo largo de los tres meses. Debido a las discrepancias observadas al comparar ambos estudios, consideramos que los resultados referentes al patrón de formación ósea a lo largo del tiempo teniendo en cuenta el tipo de recubrimiento no serían concluyentes, siendo necesarios más estudios en esta línea de investigación que puedan confirmar el posible

papel así como el beneficio de la utilización de células madres adiposas en este proceso o de la fibronectina como único recubrimiento.

Asimismo, el hecho de no observar diferencias en ambos estudios en cuanto a la cantidad de tejido óseo neoformado entre los defectos control y los tratados con un biomaterial particulado (β -TCP, β -TCP-Fn, β -TCP-Fn-ADSCs), podría apoyar la teoría de la capacidad de regeneración espontánea de este tipo de defectos maxilares (111,112), camuflando el potencial osteogénico de las células madre adiposas. Si tenemos en cuenta este aspecto, se debería valorar con precaución los resultados de ambos estudios ya que en un principio el diseño perseguía la creación de un defecto crítico que favoreciera el colapso del área regenerada e impidiera la capacidad de restitución espontánea a su situación original, siendo por lo tanto necesario modificar el defecto o el modelo experimental para confirmar el verdadero potencial regenerador de las células madre adiposas. Otra posibilidad sería modificar el tiempo, acortando los periodos en los que se obtienen las muestras, convirtiendo así un defecto subcrítico en crítico o bien dejando el defecto control sin el recubrimiento de la membrana de colágeno.

Otro factor que podría modificarse en un diseño experimental futuro sería la elección del género del animal así como su edad. A pesar de que las hembras presentan un mayor porcentaje de grasa abdominal, lo que facilita una obtención más cómoda de tejido adiposo, las células madre mesenquimales procedentes de esta zona donante presentan una menor capacidad de diferenciación hacia la estirpe osteogénica respecto a los machos, tal y como se ha comentado anteriormente (83,84), o bien podrían utilizarse animales de mayor edad con un menor potencial de regeneración espontánea.

5.3. El efecto de las células madre adiposas en los procesos de oseointegración de implantes dentales: Porcentaje de contacto hueso/implante -Bone implant contact- (BIC).

La colocación de implantes de forma simultánea a procedimientos de RO muestra unos porcentajes de supervivencia a largo plazo de los implantes similares a los colocados en hueso nativo en zonas con un volumen de óseo adecuado (132,133). Además, la regeneración de defectos de tipo dehiscencia asociados a la colocación simultánea de implantes, ha registrado buenos resultados al analizar el área total de regeneración así como el porcentaje de BIC utilizando diversos tipos de biomateriales y membranas. (45,46,111,134).

Los valores de BIC en defectos regenerados con un biomaterial recubierto de células madre adiposas y fibronectina (β -TCP-Fn-ADSCs) fueron, en términos generales, inferiores a los obtenidos por otros autores con hueso autólogo u otros tipos de biomateriales en periodos de cicatrización equivalentes (45,46,111,134). No obstante, fueron similares a los obtenidos en estudios con modelos experimentales en los que los defectos fueron tratados con células madre procedentes de médula ósea (122,135). Autores, como Ribeiro y cols. (135), observaron un mayor porcentaje de hueso neoformado y de BIC en los defectos de tipo dehiscencia tratados con células madre procedentes de la médula ósea frente a los defectos control a los tres meses de cicatrización. Ito y cols. (122) en otro estudio experimental en el que se regeneraron defectos críticos de forma simultánea a la colocación de los implantes, también obtuvieron unos porcentajes de BIC muy superiores cuando se utilizó una combinación de células madre procedentes de médula ósea con plasma rico en plaquetas

Utilización de células madre adiposas en procesos de regeneración ósea guiada en defectos de tamaño crítico de la cortical vestibular.

(PRP) y gel de fibrina frente al resto de grupos de estudio transcurridas 4 y 8 semanas de cicatrización.

En ambos estudios (Ribeiro y cols. (135) e Ito y cols. (122)) la utilización de precursores celulares mejoró los resultados de BIC al compararlos con el resto de grupos estudio o los defectos control. Sin embargo, los resultados de nuestro segundo estudio al utilizar células madre adiposas no sólo muestra valores equivalentes frente al resto de grupos a los tres meses de oseointegración, sino que los valores del segundo mes de cicatrización fueron estadísticamente inferiores a los obtenidos en el grupo control ($p=0,012$) o en los que se utilizó un biomaterial recubierto con fibronectina, aunque en este último caso solo ligeramente (β -TCP-Fn) ($p=0,041$), pudiéndose afirmar que existe una tendencia a igualar los resultados a los del grupo control. Este comportamiento durante el segundo mes de cicatrización podría estar vinculado a un mayor porcentaje de partículas de biomaterial presente en los defectos tratados con β -TCP-Fn-ADSCs (figura 14), que unido a su baja tasa de reabsorción durante los primeros meses de cicatrización, podría dificultar la neorformación de tejido mineralizado en contacto con la superficie del implante. Asimismo, autores como Mankani y cols. (100) establecen que el tamaño de la partícula influye directamente en la capacidad de formación ósea al combinarlas con células madre, siendo las dimensiones entre 0,1–0,25 mm las que registraron los mejores resultados. Si atendemos al hecho de que el tamaño medio de partícula utilizado en ambos estudios fue superior al propuesto idealmente (0,25-1 mm), la capacidad oseoformadora de las células madre se ha podido ver comprometida.

Otro factor diferenciador de estos estudios respecto al nuestro, es que en ambos se utilizó una membrana no reabsorbible reforzada con titanio para cubrir el defecto creado, permitiendo posiblemente un mejor

Utilización de células madre adiposas en procesos de regeneración ósea guiada en defectos de tamaño crítico de la cortical vestibular.

mantenimiento del espacio así como una mayor estanqueidad de la zona, factores decisivos en cualquier proceso de RO. No obstante, Schwarz y cols. (26) no confirmarían esta hipótesis dado que no encontraron diferencias en los porcentajes de BIC al comparar diferentes tipos de membrana en la regeneración de defectos de tipo dehiscencia a las 12 semanas de cicatrización.

El hecho de que en nuestro segundo estudio la utilización de células madre adiposas no mejorara los resultados de BIC frente al resto de grupos a lo largo de los tres meses de cicatrización, podría explicarse por la confluencia de diferentes factores de confusión, especialmente durante las etapas iniciales. En primer lugar, si consideramos que el papel de las células madre tiene lugar durante las primeras fases de la osteogénesis (regeneración ósea directa), ésta se pudo ver comprometida por las complicaciones postoperatorias inmediatas (dehiscencias y pérdida de biomaterial), que afectaron principalmente al grupo de células madre adiposas (figura 14). En el segundo mes de cicatrización, sin embargo, la situación se invierte, siendo el grupo de células madre adiposas la que registra unos valores de biomaterial particulado notablemente alto al compararlo con el resto de grupos. La formación de tejido mineralizado en el área de regeneración así como en contacto con la superficie del implante se pudo ver afectada debido al empaquetamiento de un biomaterial que presenta una tasa de reabsorción limitada en etapas prematuras. Este factor unido a las dimensiones de la partícula utilizada podrían ser la causa de que el grupo de células madre adiposas fuera el que registró porcentajes de BIC estadísticamente inferiores frente al grupo control o el grupo tratado con un biomaterial recubierto de fibronectina.

Es importante tener en cuenta que la falta de datos a cerca del uso de células madre de origen adiposo en procesos de regeneración de defectos

Utilización de células madre adiposas en procesos de regeneración ósea guiada en defectos de tamaño crítico de la cortical vestibular.

críticos asociados a la colocación simultánea de implantes, no permite la comparación de los resultados de nuestro segundo estudio.

5.4. *Las propiedades del β -fosfato tricálcico y la fibronectina como adyuvantes en técnicas de ingeniería tisular con células madre adiposas.*

i. El fosfato tricálcico

El sustituto óseo ideal, desde un punto de biológico y biomécanico, debe cumplir de forma eficiente las funciones de mantenedor de espacio así como de ser un material biodegradable que permita el reemplazo progresivo por hueso neoforado. Además, la utilización de determinados biomateriales como vehículos para el transporte de células madre podría tener un efecto positivo en los procesos de RO de defectos críticos, además de actuar como un elemento osteoconductor (87).

En la actualidad no existe evidencia suficiente sobre el tipo de soporte ideal, condicionado en muchas ocasiones por las dimensiones del defecto. Se han obtenido resultados prometedores con la combinación de células madre con plasma rico en plaquetas (PRP), (85,86), gel de fibrina (71,87–89), polímeros de ácido poliláctico (PLA) (90,91), una matriz extracelular sintética (92) o bien la utilización de un sustituto óseo alogénico (87,93) o sintético (96,98). No obstante, el uso de biomateriales cerámicos sintéticos (hidroxiapatita y fosfato tricálcico) han demostrado mejores condiciones al combinarlos con células madre de médula ósea en procesos de RO (50).

Las propiedades de biocompatibilidad, elevada osteoconductividad así como su falta de inmunogenicidad, convierten al fosfato tricálcico en un biomaterial de elección en técnicas de RO (96–100). Además, su capacidad de actuar como vehículo/carrier en combinación con células madre ya ha

Utilización de células madre adiposas en procesos de regeneración ósea guiada en defectos de tamaño crítico de la cortical vestibular.

demostrado resultados satisfactorios en procedimientos de ingeniería tisular (96,98,115). Otra de las propiedades del fosfato tricálcico es que al tratarse de un sustituto óseo con una elevada tasa de reabsorción, se facilita su sustitución por hueso neorformado (111,136). En ninguno de los dos estudios presentados, se observaron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la cantidad de biomaterial particulado, tejido mineralizado o tejido no mineralizado al analizar los tres grupos estudio, teniendo en cuenta el tipo de recubrimiento (β -TCP, β -TCP-Fn, β -TCP-Fn-ADSCs) o el tiempo de cicatrización (T1, T2 y T3).

Sin embargo, la cantidad de tejido no mineralizado en los grupos control del segundo estudio sí que mostró variaciones significativas considerando el tiempo de cicatrización, observándose un incremento al segundo mes. Estas variaciones en el tejido no mineralizado no fueron observadas en los defectos control del primer estudio, como consecuencia posiblemente de un mayor grado de contaminación del área regenerada (6.98% de superficie de estudio contaminada del primer estudio respecto al 5.56% del segundo). Debido a que el metabolismo de los perros es más acelerado que en el humano y a que los defectos control presentaban un menor grado de contaminación, las diferencias observadas en los defectos regenerados asociados a implantes se pueden deber al remodelado del hueso autógeno durante las fases de cicatrización tal y como proponen Schwarz y cols. (26,137).

Creemos que esta mayor contaminación de los defectos control del primer estudio se explicaría por el hecho de que la morfología del defecto presentaba mayor capacidad contenedora, mientras que en el segundo estudio el área analizada no sólo era menor (se limitaba a la zona vestibular del implante, figura 13) sino que la colocación del implante de forma

Utilización de células madre adiposas en procesos de regeneración ósea guiada en defectos de tamaño crítico de la cortical vestibular.

simultánea reduciría el espacio disponible en el interior del defecto y dificultaría la entrada de partículas.

Es precisamente la contaminación de los defectos control con biomaterial de regeneración procedente de los defectos vecinos uno de los elementos de sesgo importantes en nuestros estudios, debido seguramente a la utilización de un biomaterial particulado de gran tamaño en relación con la magnitud de los defectos y a la falta de cohesión de este material a pesar de estar rehidratado antes de su uso. Para obviar este factor, Takahashi y cols. (44) concluyen en su artículo que la utilización de fosfato tricálcico en esponjas de colágeno facilita su manipulación frente al biomaterial granulado, estando especialmente indicado en los procedimientos de preservación alveolar con defectos óseos vestibulares de tipo dehiscencia. Benic y cols.(138) se encuentran en la misma línea concluyendo que a pesar de no existir diferencias en la cantidad de tejido óseo neoformado en procesos de ROG de defectos de tipo dehiscencia entre un biomaterial particulado y un bloque de xenoinjerto, este último mantiene de forma más estable el contorno del proceso alveolar. Además, tal y como se ha comentado anteriormente, el tamaño de partícula utilizado en ambos estudio presenta un diámetro superior al recomendado por Mankani y cols. (100), factor que parece influir directamente en la capacidad oseoformadora de las células madre, como se ha comprobado con los resultados de los defectos regenerados con β -TCP-Fn-ADSCs de los estudios presentados.

Es importante tener en cuenta que la falta de plasticidad de los biomateriales particulados dificulta la adaptación de forma eficaz a la morfología de algunos defectos (defecto de tipo de dehiscencia), especialmente si son de tamaño reducido, y favorece la contaminación de los defectos vecinos durante las maniobras de sutura del campo quirúrgico así como por los propios movimientos del animal, pudiendo generar un

Utilización de células madre adiposas en procesos de regeneración ósea guiada en defectos de tamaño crítico de la cortical vestibular.

sesgo en los resultados debido a la técnica y al modelo de estudio (115). Es por este motivo que la utilización de biomateriales con una cierta plasticidad, como el gel de fibrina o el PRP, facilitaría su manipulación y adaptación y favorecerían su estabilidad e inmovilidad en los procedimientos de ingeniería tisular con células madre (124,139).

La utilización de un biomaterial con un tamaño de partícula superior al recomendado (entre 0,25-1mm), el hecho de encontrar contaminada el área de estudio de los defectos control por la proximidad entre los defectos creados, así como cubrirlos con una membrana de colágeno, y la posible capacidad de regeneración espontánea, creemos que pueden constituir factores de confusión suficientes para que no se registraran diferencias estadísticamente significativas en la cantidad y calidad de hueso neoformado entre las zonas tratadas con un biomaterial particulado (β -TCP, β -TCP-Fn, β -TCP-Fn-ADSCs) y los defectos control en ambos estudios, a pesar de ser diseñados con un tamaño crítico.

ii. La fibronectina

La fibronectina es una glicoproteína de la matriz extracelular que entre sus múltiples funciones favorece la adherencia, diferenciación y expansión celular. La utilización de fibronectina en combinación con un xenoinjerto o un biomaterial cerámico (fosfato cálcico) ha demostrado que incrementa la adhesión celular, especialmente en las primeras horas tras su cultivo (140). Esta propiedad de la fibronectina, al igual que la de algunos polímeros como el colágeno o la vitronectina, adquiere especial relevancia en procedimientos de regeneración de defectos óseos, favoreciendo la adhesión de células madre o de osteoblastos al combinarla con determinados biomateriales (90,141–143).

Utilización de células madre adiposas en procesos de regeneración ósea guiada en defectos de tamaño crítico de la cortical vestibular.

Los defectos del primer estudio tratados con un biomaterial recubierto con fibronectina y células madre adiposas (β -TCP-Fn-ADSCs), fueron los únicos que presentaron un incremento estadísticamente significativo en la cantidad de área regenerada conforme aumentaba el tiempo de cicatrización cuando no se utilizaba simultáneamente con la colocación de implantes dentales. El efecto acelerador de la fibronectina en los procesos de RO unido a las propiedades inherentes de las células madre adiposas podría estabilizar de forma más rápida el tejido regenerado, contrarrestando las fuerzas compresivas del tejido blando durante la cicatrización y manteniendo el espacio en defectos críticos evitando su colapso. No obstante, esta combinación no parece mejorar el porcentaje de área regenerada así como de tejido mineralizado al compararlo con el resto de grupos (β -TCP, β -TCP-Fn) o con el defecto control en cada uno de los tres tiempos postoperatorios analizados en ambos estudios.

Del mismo modo, si atendemos a los porcentajes de BIC en el segundo estudio, no observamos diferencias estadísticamente significativas a los tres meses entre los grupos en los que se utilizó un biomaterial con fibronectina (β -TCP-Fn-ADSCs y β -TCP-Fn) y los que no (β -TCP y grupo control). Además, es importante destacar que los defectos con células madre adiposas y fibronectina (β -TCP-Fn-ADSCs), mostraron incluso valores estadísticamente inferiores respecto a los defectos tratados únicamente con fibronectina (β -TCP-Fn) a los dos meses ($p=0.041$).

Todas estas circunstancias hacen que no puedan confirmarse las ventajas de la utilización de la fibronectina como recubrimiento de un biomaterial cerámico o en combinación con células madre adiposas en procedimientos de RO de defectos de tipo dehiscencia así como durante el proceso de oseointegración de implantes en este modelo de estudio.

Utilización de células madre adiposas en procesos de regeneración ósea guiada en defectos de tamaño crítico de la cortical vestibular.

Utilización de células madre adiposas en procesos de regeneración ósea guiada en defectos de tamaño crítico de la cortical vestibular.

6. CONCLUSIONES.

Utilización de células madre adiposas en procesos de regeneración ósea guiada en defectos de tamaño crítico de la cortical vestibular.

6. CONCLUSIONES

1. Teniendo en cuenta las limitaciones de ambos estudios experimentales, el porcentaje de tejido óseo neoformado en defectos críticos de la cortical vestibular tratados con β -TCP-Fn-ADSCs no fue superior al registrado con β -TCP sólo o recubierto con fibronectina (β -TCP-Fn), independientemente de la colocación simultánea de implantes. Asimismo, ninguno de los tres grupos estudio se mostraron superiores frente a los defectos control. Sin embargo, la utilización de células madre adiposas y fibronectina recubriendo un material fosfocálcico mantiene el espacio regenerado de forma más eficiente a los tres meses de cicatrización.
2. El recubrimiento de un biomaterial fosfocálcico con células madre adiposas y fibronectina (β -TCP-Fn-ADSCs) no mejoró los porcentajes de BIC frente a otros sustitutos óseos o al defecto control a los tres meses de cicatrización.
3. Todos los defectos regenerados sin la colocación de implantes mostraron un incremento significativo de matriz ósea neoformada a lo largo del tiempo, independientemente del tipo de recubrimiento, aunque no siguiendo un patrón uniforme. El hecho de no observarse diferencias significativas entre los defectos regenerados y el defecto control en ambos estudios estaría asociado a factores de confusión (el diseño del defecto, el tamaño de partícula, a la contaminación por material de regeneración de los defectos adyacentes así como por el hecho de cubrirlos con una membrana de colágeno).

Utilización de células madre adiposas en procesos de regeneración ósea guiada en defectos de tamaño crítico de la cortical vestibular.

4. Los implantes regenerados con un biomaterial recubierto con células madre adiposas y fibronectina no sólo no mejoró los índices de BIC a lo largo de los tres meses de cicatrización frente al resto de defectos sino que incluso registró valores estadísticamente inferiores a los defectos tratados con β -TCP-Fn o al defecto control a los dos meses de cicatrización ($p=0.041$ y $p=0.012$).

5. La combinación de células madre adiposas con fibronectina como recubrimiento de un biomaterial fosfocálcico no parece incrementar el porcentaje de hueso neoformado en contacto con las partículas en procesos de regeneración de defectos críticos de la cortical vestibular.

Utilización de células madre adiposas en procesos de regeneración ósea guiada en defectos de tamaño crítico de la cortical vestibular.

Utilización de células madre adiposas en procesos de regeneración ósea guiada en defectos de tamaño crítico de la cortical vestibular.

7. BIBLIOGRAFÍA.

Utilización de células madre adiposas en procesos de regeneración ósea guiada en defectos de tamaño crítico de la cortical vestibular.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Carmagnola D, Araújo M, Berglundh T, Albrektsson T, Lindhe J. Bone tissue reaction around implants placed in a compromised jaw. *J Clin Periodontol.* 1999;26:629–35.
2. Araújo MG, Lindhe J. Dimensional ridge alterations following tooth extraction. An experimental study in the dog. *J Clin Periodontol.* 2005;32:212–8.
3. Retzepi M, Donos N. Guided Bone Regeneration: biological principle and therapeutic applications. *Clin Oral Impl Res.* 2010;21:567–76.
4. Chiapasco M, Zaniboni M. Clinical outcomes of GBR procedures to correct peri-implant dehiscences and fenestrations: a systematic review. *Clin Oral Impl Res.* 2009;20:113–23.
5. Khojasteh A, Behnia H, Dashti SG, Stevens M. Current trends in mesenchymal stem cell application in bone augmentation: a review of the literature. *J Oral Maxillofac Surg.* 2012;70:972–82.
6. Petrovic V, Zivkovic P, Petrovic D, Stefanovic V. Craniofacial bone tissue engineering. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2012;114:1–9.
7. Ruoslahti E. RGD and other recognition sequences for integrins. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 1996;697–715.
8. Fernández-Tresguerres-Hernández-Gil I, Alobera Gracia M, del Canto Pingarrón M, Blanco Jerez L. Bases fisiológicas de la regeneración ósea I. *Histología y fisiología del tejido óseo. Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2006;11:47–51.
9. Soltan M, Smiler D, Choi JH. Bone Marrow: orchestrated cells,

- cytokines, and growth factors for bone regeneration. *Implant Dent.* 2009;18:132–41.
10. Bosshardt D, Schenk R. (2012). Principios biológicos de la regeneración ósea. En: D. Buser (Ed.), *20 años de regeneración ósea guiada en implantología oral* (pp. 15-46). Barcelona: Editorial Quintessence, S.L.
 11. Clarke B. Normal bone anatomy and physiology. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2008;3:131–9.
 12. Soltan M, Rohrer MD, Prasad HS. Monocytes: super cells for bone regeneration. *Implant Dent.* 2012;21:13–20.
 13. Fernández-Tresguerres Hernández-Gil I, Alobera Gracia M, del Canto Pingarrón M, Blanco Jerez L. Bases fisiológicas de la regeneración ósea II . El proceso de remodelado. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2006;11:151–7.
 14. García AJ, Reyes CD. Bio-adhesive surfaces to promote osteoblast differentiation and bone formation. *J Dent Res.* 2005;84:407–13.
 15. Hynes R. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell.* 2002;110:673–87.
 16. Nyman S, Gottlow J, Karring T, Lindhe J. The regenerative potential of the periodontal ligament. An experimental study in the monkey. *J Clin Periodontol.* 1982;9:257–65.
 17. Nyman S, Gottlow J, Lindhe J, Karring T, Wennstrom J. New attachment formation by guided tissue regeneration. *J Periodontal Res.* 1987;22:252–4.
 18. Fu J, Wang H-L. Horizontal Bone Augmentation : The Decision Tree. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 2011;31:429–36.
 19. Rompen EH, Biewer R, Vanheusden A, Zahedi S, Nusgens B. The

- influence of cortical perforations and of space filling with peripheral blood on the kinetics of guided bone generation. A comparative histometric study in the rat. *Clin Oral Impl Res.* 1999;10:85–94.
20. Greenstein G, Greenstein B, Cavallaro J, Tarnow D. The role of bone decortication in enhancing the results of guided bone regeneration: a literature review. *J Periodontol.* 2009;80:175–89.
 21. Lee SH, Lim P, Yoon HJ. The influence of cortical perforation on guided bone regeneration using synthetic bone substitutes : A study of rabbit cranial defects. *Int J Oral Maxillofac Implant.* 2014;29:464–71.
 22. Schenk RK, Buser D, Hardwick WR, Dahlin C. Healing pattern of bone regeneration in membrane-protected defects: a histologic study in the canine mandible. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1994;9:13–29.
 23. Rakhmatia YD, Ayukawa Y, Furuhashi A, Koyano K. Current barrier membranes: Titanium mesh and other membranes for guided bone regeneration in dental applications. *J Prosthodont Res.* 2013;57:3–14.
 24. Zellin G, Linde A. Effects of different osteopromotive membrane porosities on experimental bone neogenesis in rats. *Biomaterials.* 1996;17:695–702.
 25. Lundgren AK, Sennerby L, Lundgren D. Guided jaw-bone regeneration using an experimental rabbit model. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 1998;27:135–40.
 26. Schwarz F, Rothamel D, Herten M, Wüstefeld M, Sager M, Ferrari D et al. Immunohistochemical characterization of guided bone regeneration at a dehiscence-type defect using different barrier membranes : an experimental study in dogs. *Clin Oral Impl Res.* 2008;19:402–15.
 27. Hämmerle CH, Jung RE. Bone augmentation by means of barrier

- membranes. *Periodontol* 2000. 2003;33:36–53.
28. Rothamel D, Schwarz F, Sager M, Herten M, Sculean A, Becker J. Biodegradation of differently cross- linked collagen membranes : an experimental study in the rat. *Clin Oral Impl Res*. 2005;16:369–78.
 29. Matsumoto G, Hoshino J, Kinoshita Y, Sugita Y, Kubo K, Maeda H, et al. Evaluation of guided bone regeneration with poly(lactic acid-co-glycolic acid-co- ϵ -caprolactone) porous membrane in lateral bone defects of the canine mandible. *Int J Oral Maxillofac Implant*. 2012;27:587–94.
 30. Dimitriou R, Mataliotakis G, Giorgio MC, Giannoudis P V. The role of barrier membranes for guided bone regeneration and restoration of large bone defects : current experimental and clinical evidence. *BMC Med*. 2012;10:81. doi: 10.1186/1741-7015-10-81.
 31. Hutmacher D, Hürzeler MB, Schliephake H. A review of material properties of biodegradable and bioresorbable polymers and devices for GTR and GBR applications. *Int J Oral Maxillofac Implant*. 1996;11:667–78.
 32. Warrer K, Karring T, Nyman S, Gogolewski S. Guided tissue regeneration using biodegradable membranes of polylactic acid or polyur- ethane. *J Clin Periodontol*. 1992;19:633–40.
 33. Zhang J, Xu Q, Huang C, Mo A, Li J, Zuo Y. Biological properties of an anti-bacterial membrane for guided bone regeneration: an experimental study in rats. *Clin Oral Impl Res*. 2010;21:321–7.
 34. De Macedo NL, De Macedo LG, Monteiro Ado S. Calcium sulfate and PTFE nonporous barrier for regeneration of experimental bone defects. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2008;13:375–9.
 35. Froum S, Cho SC, Elian N, Rosenberg E, Rohrer M, Tarnow D.

- Extraction sockets and implantation of hydroxyapatites with membrane barriers: a histologic study. *Implant Dent.* 2004;13:153–64.
36. Fotek PD, Neiva RF, Wang HL. Comparison of dermal matrix and polytetrafluoroethylene membrane for socket bone augmentation: a clinical and histologic study. *J Periodontol.* 2009;80:776–85.
 37. Bartee BK. The use of high-density polytetrafluoroethylene membrane to treat osseous defects: clinical reports. *Implant Dent.* 1995;4:21–6.
 38. Wang RR, Fenton A. Titanium for prosthodontic applications: a review of the literature. *Quintessence Int.* 1996;27:401–8.
 39. Degidi M, Scarano A, Piattelli A. Regeneration of the alveolar crest using titanium micromesh with autologous bone and a resorbable membrane. *J Oral Implant.* 2003;29:86–90.
 40. von Arx T, Cochran DL, Hermann JS, Schenk RK, Higginbottom FL, Buser D. Lateral ridge augmentation and implant placement: an experimental study evaluating implant osseointegration in different augmentation materials in the canine mandible. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2001;16:343–54.
 41. Buser D, Dula K, Belser UC, Hirt HP, Berthold H. Localized ridge augmentation using guided bone regeneration. II. Surgical procedure in the mandible. *Int J Periodontics Restor Dent.* 1995;15:10–29.
 42. Lang NP, Hämmelerle CH, Brägger U, Lehmann B, Nyman SR. Guided tissue regeneration in jawbone defects prior to implant placement. *Clin Oral Impl Res.* 1994;5:92–7.
 43. Oh TJ, Meraw SJ, Lee EJ, Giannobile WV, Wang HL. Comparative analysis of collagen membranes for the treatment of implant dehiscence defects. *Clin Oral Impl Res.* 2003;14:80–90.

44. Takahashi Y, Marukawa E, Omura K. Application of a new material (β -TCP/Collagen Composites) in extraction socket preservation: An experimental study in dogs. *Int J Oral Maxillofac Implant.* 2013;28:444–52.
45. Lee JS, Ko SH, Kim YT, Jung UW, Choi SH. Guided bone regeneration using cyanoacrylate-combined calcium phosphate in a dehiscence defect: a histologic study in dogs. *J Oral Maxillofac Surg.* 2012;70:2070–9.
46. Li X, Wang X, Zhao T, Gao B, Miao Y, Zhang D, et al. Guided bone regeneration using chitosan-collagen membranes in dog dehiscence-type defect model. *J Oral Maxillofac Surg.* 2014;72:1–14.
47. Schwarz F, Sahm N, Becker J. Impact of the outcome of guided bone regeneration in dehiscence-type defects on the long-term stability of peri-implant health: clinical observations at 4 years. *Clin Oral Impl Res.* 2012;23:191–6.
48. Aghaloo TL, Moy PK. Which hard tissue augmentation techniques are the most successful in furnishing bony support for implant placement? *Int J Oral Maxillofac Implant.* 2007;22:49–70.
49. Tevlin R, McArdle A, Atashroo D, Walmsley GG, Senarath-Yapa K, Zielins ER, et al. Biomaterials for craniofacial bone engineering. *J Dent Res.* 2014;93:1187–95.
50. Robey PG, Bianco P. The use of adult stem cells in rebuilding the human face. *J Am Dent Assoc.* 2006;137:961–72.
51. Zaky SH, Cancedda R. Engineering craniofacial structures: facing the challenge. *J Dent Res.* 2009;88:1077–91.
52. Ward BB, Brown SE, Krebsbach PH. Bioengineering strategies for regeneration of craniofacial bone: a review of emerging technologies.

- Oral Dis. 2010;16:709–16.
53. Friedenstein AJ, Piatetzky-Shapiro II, Petrakova KV. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryol Exp Morphol.* 1966;16:381-90.
 54. Owen M, Friedenstein A. Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors. *Ciba Found Symp.* 1988;136:42–60.
 55. Silvério KG, Rodrigues TL, Coletta RD, Benevides L, Da Silva JS, Casati MZ, et al. Mesenchymal stem cell properties of periodontal ligament cells from deciduous and permanent teeth. *J Periodontol.* 2010;81:1207–15.
 56. Strioga M, Viswanathan S, Darinskas A, Slaby O, Michalek J. Same or not the same? Comparison of adipose tissue-derived versus bone marrow-derived mesenchymal stem and stromal cells. *Stem Cells Dev.* 2012;21:2724–52.
 57. Padial-Molina M, O'Valle F, Lanis A, Mesa F, Dohan Ehrenfest DM, Wang HL, et al. Clinical application of mesenchymal stem cells and novel supportive therapies for oral bone regeneration. *Biomed Res Int.* 2015. doi: 10.1155/2015/341327.
 58. Yin L, Cheng W, Qin Z, Yu H, Yu Z, Zhong M, et al. Effects of naringin on proliferation and osteogenic differentiation of human periodontal ligament stem cells in vitro and in vivo. *Stem Cells Int.* 2015. doi: 10.1155/2015/758706.
 59. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell.* 2006;126:663–76.
 60. Mitalipov S, Wolf D. Totipotency, pluripotency and nuclear reprogramming. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 2009;114:185–99.

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;8:315–7.
62. Bernardo ME, Locatelli F, Fibbe WE. Mesenchymal stromal cells. *Ann NY Acad Sci*. 2009;1176:101–17.
63. Mosna F, Sensebé L, Krampera M. Human bone marrow and adipose tissue mesenchymal stem cells: a user's guide. *Stem Cells Dev*. 2010;19:1449–70.
64. Prockop D, Brenner M, Fibbe W, Horwitz E, Le Blanc K, Phinney D, et al. Defining the risks of mesenchymal stromal cell therapy. *Cytotherapy*. 2010;12:576–8.
65. Tarte K, Gaillard J, Lataillade JJ, Fouillard L, Becker M, Mossafa H, et al. Clinical-grade production of human mesenchymal stromal cells: occurrence of aneuploidy without transformation. *Blood*. 2010;115:1549–53.
66. Bernardo ME, Zaffaroni N, Novara F, Cometa A, Avanzini M, Moretta A, et al. Human bone marrow derived mesenchymal stem cells do not undergo transformation after long-term in vitro culture and do not exhibit telomere maintenance mechanisms. *Cancer Res*. 2007;67:9142–9.
67. Van RL, Bayliss CE, Roncari DA. Cytological and enzymological characterization of adult human adipocyte precursors in culture. *J Clin Invest*. 1976;58:699–704.
68. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz A, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng*. 2001;7:211–28.

69. Mizuno H. Adipose-derived stem cells for regenerative medicine in the field of plastic and reconstructive surgery. *J Oral Biosci.* 2013;55:132–6.
70. De Ugarte DA, Alfonso Z, Zuk PA, Elbarbary A, Zhu M, Ashjian P, et al. Differential expression of stem cell mobilization-associated molecules on multilineage cells from adipose tissue and bone marrow. *Immunol Lett.* 2003;89:267–70.
71. Han DS, Chang HK, Kim KR, Woo SM. Consideration of bone regeneration effect of stem cells: comparison of bone regeneration between bone marrow stem cells and adipose-derived stem cells. *J Craniofac Surg.* 2014;25:196–201.
72. Mizuno H, Tobita M, Uysal AC. Concise review: adipose-derived stem cells as a novel tool for future regenerative medicine. *Stem Cells.* 2012;30:804–10.
73. Brayfield CA, Marra KG, Rubin JP. Adipose tissue regeneration. *Curr Stem Cell Res Ther.* 2010;5:116–21.
74. Schipper BM, Marra KG, Zhang W, Donnenberg AD, Rubin JP. Regional anatomic and age effects on cell function of human adipose-derived stem cells. *Ann Plast Surg.* 2008;60:538–44.
75. Zhu Y, Liu T, Song K, Fan X, Ma X, Cui Z. Adipose-derived stem cell: a better stem cell than BMSC. *Cell Biochem Funct.* 2008;26:664–75.
76. Izadpanah R, Trygg C, Patel B, Kriedt C, Dufour J, Gimble JM, et al. Biologic properties of mesenchymal stem cells derived from bone marrow and adipose tissue. *J Cell Biochem.* 2006;99:1285–97.
77. Kern S, Eichler H, Stoeve J, Klüter H, Bieback K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical

- cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells*. 2006;24:1294–301.
78. Zuk P. Adipose-derived stem cells in tissue regeneration : a review. *ISRN Stem Cells*. vol. 2013, Article ID 713959, 35 pages, 2013. doi:10.1155/2013/713959.
 79. Bailey AM, Kapur S, Katz AJ. Characterization of adipose-derived stem cells: an update. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2010;5:95–102.
 80. Pachón-Peña G, Yu G, Tucker A, Wu X, Vendrell J, Bunnell BA, et al. Stromal stem cells from adipose tissue and bone marrow of age-matched female donors display distinct immunophenotypic profiles. *J Cell Physiol*. 2011;226:843–51.
 81. Bochev I, Elmadjian G, Kyurkchiev D, Tzvetanov L, Altankova I, Tivchev P, et al. Mesenchymal stem cells from human bone marrow or adipose tissue differently modulate mitogen-stimulated B-cell immuno- globulin production in vitro. *Cell Biol Int*. 2008;32:384–93.
 82. De Ugarte DA, Morizono K, Elbarbary A, Alfonso Z, Zuk PA, Zhu M, et al. Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow. *Cells Tissues Organs*. 2003;174:101–9.
 83. Zhu M, Kohan E, Bradley J, Hedrick M, Benhaim P, Zuk P. The effect of age on osteogenic, adipogenic and proliferative potential of female adipose-derived stem cells. *J Tissue Eng Regen Med*. 2009;3:290–301.
 84. Lindroos B, Suuronen R, Miettinen S. The potential of adipose stem cells in regenerative medicine. *Stem Cell Rev*. 2011;7:269–91.
 85. Yamada Y, Ueda M, Hibi H, Nagasaka T. Translational research for injectable tissue-engineered bone regeneration using mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma: from basic research to clinical case study. *Cell Transplant*. 2004;13:343–55.

86. Yamada Y, Ueda M, Naiki T, Nagasaka T. Tissue-engineered injectable bone regeneration for osseointegrated dental implants. *Clin Oral Impl Res.* 2004;15:589–97.
87. Han DS, Chang HK, Park JH, Kim KR, Woo SM. Consideration of bone regeneration effect of stem cells: comparison between adipose-derived stem cells and demineralized bone matrix. *J Craniofac Surg.* 2014;25:189–95.
88. Hayashi O, Katsube Y, Hirose M, Ohgushi H, Ito H. Comparison of osteogenic ability of rat mesenchymal stem cells from bone marrow, periosteum, and adipose tissue. *Calcif Tissue Int.* 2008;82:238–47.
89. Lee L-T, Kwan P-C, Chen Y-F, Wong Y-K. Comparison of the effectiveness of autologous fibrin glue and macroporous biphasic calcium phosphate as carriers in the osteogenesis process with or without mesenchymal stem cells. *J Chin Med Assoc.* 2008;71:66–73.
90. Di Bella C, Farlie P, Penington AJ. Bone regeneration in a rabbit critical-sized skull defect using autologous adipose-derived cells. *Tissue Eng Part A.* 2008;14:483–90.
91. El-Amin SF, Lu HH, Khan Y, Burems J, Mitchell J, Tuan RS, et al. Extracellular matrix production by human osteoblasts cultured on biodegradable polymers applicable for tissue engineering. *Biomaterials.* 2003;24:1213–21.
92. Yoshimi R, Yamada Y, Ito K, Nakamura S, Abe A, Nagasaka T, et al. Self-assembling peptide nanofiber scaffolds, platelet-rich plasma, and mesenchymal stem cells for injectable bone regeneration with tissue engineering. *J Craniofac Surg.* 2009;20:1523–30.
93. Cornejo A, Sahar DE, Stephenson SM, Chang S, Nguyen S, Guda T, et al. Effect of adipose tissue-derived osteogenic and endothelial cells

- on bone allograft osteogenesis and vascularization in critical-sized calvarial defects. *Tissue Eng Part A*. 2012;18:1552-61.
94. Mastrogiacomo M, Scaglione S, Martinetti R, Dolcini L, Beltrame F, Cancedda R, et al. Role of scaffold internal structure on in vivo bone formation in macroporous calcium phosphate bioceramics. *Biomaterials*. 2006;27:3230–7.
 95. Cancedda R, Giannoni P, Mastrogiacomo M. A tissue engineering approach to bone repair in large animal models and in clinical practice. *Biomaterials*. 2007;28:4240–50.
 96. Jafarian M, Eslaminejad MB, Khojasteh A, Mashhadi Abbas F, Dehghan MM, Hassanizadeh R, et al. Marrow-derived mesenchymal stem cells-directed bone regeneration in the dog mandible: a comparison between biphasic calcium phosphate and natural bone mineral. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2008;105:14–24.
 97. De Kok IJ, Drapeau SJ, Young R, Cooper LF. Evaluation of mesenchymal stem cells following implantation in alveolar sockets: a canine safety study. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2005;20:511–8.
 98. Yuan J, Cui L, Zhang WJ, Liu W, Cao Y. Repair of canine mandibular bone defects with bone marrow stromal cells and porous beta-tricalcium phosphate. *Biomaterials*. 2007;28:1005–13.
 99. Bose S, Tarafder S. Calcium phosphate ceramic systems in growth factor and drug delivery for bone tissue engineering: a review. *Acta Biomater*. 2012;8:1401–21.
 100. Mankani MH, Kuznetsov SA, Fowler B, Kingman A, Robey PG. In vivo bone formation by human bone marrow stromal cells: effect of carrier particle size and shape. *Biotechnol Bioeng*. 2001;72:96–107.

101. Bohner M. Calcium orthophosphates in medicine: from ceramics to calcium phosphate cements. *Injury*. 2000;4:37–47.
102. Rojbaní H, Nyan M, Ohya K, Kasugai S. Evaluation of the osteoconductivity of α -tricalcium phosphate, β -tricalcium phosphate, and hydroxyapatite combined with or without simvastatin in rat calvarial defect. *J Biomed Mater Res A*. 2011;98:488-98.
103. Wozney JM, Seeherman HJ. Protein-based tissue engineering in bone and cartilage repair. *Curr Opin Biotechnol*. 2004;15:392–8.
104. Zimmerman D, Jin F, Leboy P, Hardy S, Damsky C. Impaired bone formation in transgenic mice resulting from altered integrin function in osteoblasts. *Dev Biol*. 2000;220:2–15.
105. Donath K, Breuner G. A method for the study of undecalcified bones and teeth with attached soft tissues. The Säge-Schliff (sawing and grinding) technique. *J Oral Pathol Med*. 1982;11:318–26.
106. Laczko J, Levai G. A simple differential staining method for semi-thin sections of ossifying cartilage and bone tissues embedded in epoxy resin. *Mikroskopie*. 1975;31:1–4.
107. Machado E, Fernandes MH, Gomes PDS. Dental stem cells for craniofacial tissue engineering. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2012;113:728–33.
108. Delgado-Ruiz RA, Calvo-Guirado JL, Romanos GE. Critical size defects for bone regeneration experiments in rabbit calvariae: systematic review and quality evaluation using ARRIVE guidelines. *Clin Oral Impl Res*. 2015;26:915–30.
109. Vignoletti F, Abrahamsson I. Quality of reporting of experimental research in implant dentistry. Critical aspects in design, outcome assessment and model validation. *J Clin Periodontol*. 2012;39:6–27.

110. Cooper GM, Mooney MP, Gosain AK, Campbell PG, Losee JE, Huard J. Testing the critical size in calvarial bone defects: revisiting the concept of a critical-size defect. *Plast Reconstr Surg.* 2010;125:1685–92.
111. Schwarz F, Herten M, Ferrari D, Wieland M, Schmitz L, Engelhardt E, et al. Guided bone regeneration at dehiscence-type defects using biphasic hydroxyapatite + beta tricalcium phosphate (Bone Ceramic) or a collagen-coated natural bone mineral (BioOss Collagen): an immunohistochemical study in dogs. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2007;36:1198-206.
112. Hanisch O, Sorensen RG, Kinoshita A, Spiekermann H, Wozney JM, Wikesjö UM. Effect of recombinant human bone morphogenetic protein-2 in dehiscence defects with non-submerged immediate implants: an experimental study in *Cynomolgus* monkeys. *J Periodontol.* 2003;74:648-57.
113. Goldberg AM, Zurlo J, Rudacille D. The three Rs and biomedical research. *Science.* 1996;272:1403.
114. Vanda-Cantón B. La experimentación biomédica en animales en los códigos bioéticos. *Lab Acta.* 2003;15:69–73.
115. Khoshzaban A, Mehrzad S, Tavakoli V, Keshel S, Behrouzi G, Bashtar M. The comparative effectiveness of demineralized bone matrix, beta-tricalcium phosphate, and bovine-derived anorganic bone matrix on inflammation and bone formation using a paired calvarial defect model in rats. *Clin Cosmet Investig Dent.* 2011;3:69–78.
116. Mir-Mari J, Wui H, Jung RE, Hämmerle CH, Benic GI. Influence of blinded wound closure on the volume stability of different GBR

- materials: an in vitro cone-beam computed tomographic examination. Clin Oral Impl Res. 2015;00:1–8.
117. Carpio L, Loza J, Lynch S, Genco R. Guided bone regeneration around endosseous implants with anorganic bovine bone mineral. A randomized controlled trial comparing bioabsorbable versus non-resorbable barriers. J Periodontol. 2000;71:1743–9.
 118. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. Mol Biol Cell. 2002;13:4279-95.
 119. Streckbein P, Jäckel S, Malik CY, Obert M, Kähling C, Wilbrand JF, et al. Reconstruction of critical-size mandibular defects in immunoincompetent rats with human adipose-derived stromal cells. J Craniomaxillofac Surg. 2013;41:496–503.
 120. Alvira-González J, Sánchez-Garcés M, Cairó J, del Pozo M, Sánchez C, Gay-Escoda C. Assessment of bone regeneration using adipose-derived stem cells in critical-size alveolar ridge defects: an experimental study in a dog model. Int J Oral Maxillofac Implants. 2016;31:196–203.
 121. De Kok IJ, Peter SJ, Archambault M, van den Bos C, Kadiyala S, Aukhil I, et al. Investigation of allogeneic mesenchymal stem cell-based alveolar bone formation: preliminary findings. Clin Oral Impl Res. 2003;14:481-9.
 122. Ito K, Yamada Y, Naiki T, Ueda M. Simultaneous implant placement and bone regeneration around dental implants using tissue-engineered bone with fibrin glue, mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma. Clin Oral Impl Res. 2006;17:579–86.
 123. Khojasteh A, Eslaminejad MB, Nazarian H. Mesenchymal stem cells

- enhance bone regeneration in rat calvarial critical size defects more than platelet-rich plasma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2008;106:356–62.
124. Yamada Y, Ueda M, Naiki T, Takahashi M, Hata K, Nagasaka T. Autogenous injectable bone for regeneration with mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma: tissue-engineered bone regeneration. *Tissue Eng.* 2004;10:955-64.
125. Hattori H, Sato M, Masuoka K, Ishihara M, Kikuchi T, Matsui T, et al. Osteogenic potential of human adipose tissue-derived stromal cells as an alternative stem cell source. *Cells Tissues Organs.* 2004;178:2–12.
126. Zaminy A, Ragerdi Kashani I, Barbarestani M, Hedayatpour A, Mahmoudi R, Farzaneh Nejad A. Osteogenic differentiation of rat mesenchymal stem cells from adipose tissue in comparison with bone marrow mesenchymal stem cells: melatonin as a differentiation factor. *Iran Biomed J.* 2008;12:133–41.
127. Im GI, Shin YW, Lee KB. Do adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have the same osteogenic and chondrogenic potential as bone marrow-derived cells? *Osteoarthritis Cartilage.* 2005;13:845–53.
128. Stockmann P, Park J, von Wilmowsky C, Nkenke E, Felszeghy E, Dehner JF, et al. Guided bone regeneration in pig calvarial bone defects using autologous mesenchymal stem/progenitor cells - a comparison of different tissue sources. *J Craniomaxillofac Surg.* 2012;40:310–20.
129. Kang BJ, Ryu HH, Park SS, Koyama Y, Kikuchi M, Woo HM, et al. Comparing the osteogenic potential of canine mesenchymal stem cells derived from adipose tissues, bone marrow, umbilical cord

- blood, and Wharton's jelly for treating bone defects. *J Vet Sci.* 2012;13:299–310.
130. Pourebrahim N, Hashemibeni B, Shahnasari S, Torabinia N, Mousavi B, Adibi S, et al. A comparison of tissue-engineered bone from adipose-derived stem cell with autogenous bone repair in maxillary alveolar cleft model in dogs. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2013;42:562–8.
131. Bohnenblust ME, Steigelman MB, Wang Q, Walker JA, Wang HT. An experimental design to study adipocyte stem cells for reconstruction of calvarial defects. *J Craniofac Surg.* 2009;20:340–6.
132. Benic GI, Jung RE, Siegenthaler DW, Hämmerle CH. Clinical and radiographic comparison of implants in regenerated or native bone : 5-year results. *Clin Oral Impl Res.* 2009;20:507-13.
133. Corrente G, Abundo R, Cardaropoli D, Cardaropoli G, Martuscelli G. Long-term evaluation of osseointegrated implants in regenerated and nonregenerated bone. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 2000;20:390–7.
134. Lee SH, Yoon HJ, Park MK, Kim YS. Guided bone regeneration with the combined use of resorbable membranes and autogenous drilling dust or xenografts for the treatment of dehiscence-type defects around implants: an experimental study in dogs. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2008;23:1089–94.
135. Ribeiro FV, Suaid FF, Ruiz KG, Rodrigues TL, Carvalho MD, Nociti FH Jr, et al. Effect of autologous bone marrow-derived cells associated with guided bone regeneration or not in the treatment of peri-implant defects.. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2012;41:121-7.
136. Suba Z, Takács D, Gyulai-Gaál S, Kovács K. Facilitation of beta-

- tricalcium phosphate-induced alveolar bone regeneration by platelet-rich plasma in beagle dogs: a histologic and histomorphometric study. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2004;19:832-8.
137. Schwarz F, Sager M, Ferrari D, Hertel M, Wieland M, Becker J. Bone regeneration in dehiscence-type defects at non-submerged and submerged chemically modified (SLActive) and conventional SLA titanium implants: an immunohistochemical study in dogs. *J Clin Periodontol.* 2008;35:64–75.
138. Benic GI, Thoma DS, Muñoz F, Sanz Martin I, Jung RE, Hämmerle CH. Guided bone regeneration of peri-implant defects with particulated and block xenogenic bone substitutes. *Clin Oral Impl Res.* 2016;27:567–76.
139. Yamada Y, Boo JS, Ozawa R, Nagasaka T, Okazaki Y, Hata K, et al. Bone regeneration following injection of mesenchymal stem cells and fibrin glue with a biodegradable scaffold. *J Craniomaxillofac Surg.* 2003;31:27-33.
140. Jo YJ, Kim KH, Koo KT, Kim TI, Seol YJ, Lee YM, et al. Initial adhesion of bone marrow stromal cells to various bone graft substitutes. *J Periodontal Implant Sci.* 2011;41:67–72.
141. Bruder SP, Kurth AA, Shea M, Hayes WC, Jaiswal N, Kadiyala S. Bone regeneration by implantation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells. *J Orthop Res.* 1998;16:155–62.
142. Park JM, Koak JY, Jang JH, Han CH, Kim SK, Heo SJ. Osseointegration of anodized titanium implants coated with fibroblast growth factor-fibronectin (FGF-FN) fusion protein. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2006;21:859–66.
143. Lee SJ, Lim GJ, Lee JW, Atala A, Yoo JJ. In vitro evaluation of a

Utilización de células madre adiposas en procesos de regeneración ósea guiada en defectos de tamaño crítico de la cortical vestibular.

poly (lactide-co-glycolide)-collagen composite scaffold for bone regeneration. *Biomaterials*. 2006;27:3466-72.

Utilización de células madre adiposas en procesos de regeneración ósea guiada en defectos de tamaño crítico de la cortical vestibular.

Utilización de células madre adiposas en procesos de regeneración ósea guiada en defectos de tamaño crítico de la cortical vestibular.

8. ANEXO.

Utilización de células madre adiposas en procesos de regeneración ósea guiada en defectos de tamaño crítico de la cortical vestibular.

Assessment of Bone Regeneration Using Adipose-Derived Stem Cells in Critical-Size Alveolar Ridge Defects: An Experimental Study in a Dog Model

Joaquín Alvira-González, DDS, MS¹/María Àngels Sánchez-Garcés, MD, DDS, PhD²/
Joan R. Barbany Cairó, MD, ScB, PhD³/Manuel Reina del Pozo, PhD⁴/
Claudia Müller Sánchez, PhD⁵/Cosme Gay-Escoda, MD, DDS, MS, PhD⁶

Purpose: To assess bone regeneration potential of a fibronectin- and adipose-derived stem cell-covered ceramic biomaterial in three-wall critical-size alveolar ridge defects. **Materials and Methods:** In 18 dogs, four dehiscence-type and critical-size defects were created surgically in the edentulous alveolar ridge. Defects were randomly regenerated using biomaterials coated with particulate β -tricalcium phosphate (β -TCP), β -TCP with fibronectin (Fn) (β -TCP-Fn), and β -TCP with a combination of Fn and autologous adipose-derived stem cells (ADSCs) (β -TCP-Fn-ADSCs), leaving one defect as control. The animals were divided into three groups according to the time of euthanasia (1, 2, or 3 months of healing). **Results:** At the time of sacrifice, statistically significant differences between the four types of defects in the total area of bone regeneration, percentage of neoformed bone matrix, medullary space, or contact between particulate biomaterial and neoformed bone matrix were not found. All defects showed a significant increase in neoformed bone matrix as sacrifice was delayed, but a uniform pattern was not followed. Only defects treated with β -TCP-Fn-ADSCs showed a significant increase in the bone regeneration area when animals sacrificed at 3 months were compared to those sacrificed at 1 month ($P = .006$). **Conclusion:** The use of ADSCs in bone regeneration processes of critical-size defects of the alveolar ridge did not entail an advantage regarding greater bone regeneration as compared with other biomaterials. However, the use of β -TCP coated with a combination of Fn and ADSCs appeared to favor stabilization of the regenerated area, allowing a more efficient maintenance of the space at 3 months of healing. INT J ORAL MAXILLOFAC IMPLANTS 2016;31:196–203. doi: 10.11607/jomi.4190

Keywords: adipose-derived stem cells, dehiscence-type defect, fibronectin, guided bone regeneration, stem cells

¹Oral Surgery and Implantology Department, Faculty of Dentistry, University of Barcelona, Spain; Researcher, "Fundació Institut d'Investigació Biomedica de Bellvitge" (IDIBELL Institute), L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain.

²Associate Professor of Oral Surgery, Professor, Master Degree Program in Oral Surgery and Implantology, Faculty of Dentistry, University of Barcelona; Researcher, "Fundació Institut d'Investigació Biomedica de Bellvitge" (IDIBELL Institute), L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain.

³Full Professor, Human Physiology, Department of Physiological Sciences II, Faculty of Medicine, University of Barcelona, Campus de Bellvitge, Barcelona, Spain.

⁴Associate Professor of Cell Biology, Celltec-UB, Department of Cell Biology, Faculty of Biology, University of Barcelona, Barcelona, Spain.

⁵Researcher, Celltec-UB, Department of Cell Biology, Faculty of Biology, University of Barcelona, Barcelona, Spain.

⁶Chairman and Professor of Oral and Maxillofacial Surgery, Director of Master Degree Program in Oral Surgery and Implantology, Faculty of Dentistry, University of Barcelona; Coordinator and Researcher, "Fundació Institut d'Investigació Biomedica de Bellvitge" (IDIBELL Institute), L'Hospitalet de Llobregat, and Oral and Maxillofacial Surgery Department, Hospital Quirón Teknon, Barcelona, Spain.

Correspondence to: Dr Cosme Gay-Escoda, Hospital Quirón Teknon, C/ Vilana 12, E-08022 Barcelona, Spain. Fax: +34 93 3933070. Email: cgay@ub.edu

©2016 by Quintessence Publishing Co Inc.

Implant placement is sometimes limited by critical defects in the edentulous alveolar ridge that occur following traumatic tooth extraction, tooth infections, or postextraction alveolar bone resorption. Large buccal cortical bone defects compromise both placement of implants and esthetic rehabilitation.¹ Various techniques have been used for restoration of bone defects, including autografts, xenografts, allografts, and alloplasts with and without barrier membranes. Although autogenous bone grafting is accepted as the gold standard of care,^{2–7} this method is associated with substantial morbidity and is limited in supply. Tissue engineering is a clinical alternative to autogenous bone grafts, and involves the morphogenesis of new tissue using constructs formed from isolated cells with biocompatible scaffolds and growth factors.^{2,6} Bone marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) have been the main source for bioengineering. However, the clinical use of MSCs has presented problems, including morbidity and low cell number upon harvest. This has led many researchers to investigate alternate sources for MSCs with similar potential to differentiate into lineages of mesenchymal tissue.^{5,8–13}

Adipose-derived stem cells may represent a viable alternative option to bone marrow-derived MSCs since both are multipotent (capacity to give rise to a variety of other differentiated cell types, including osteocytes, chondrocytes, adipocytes, and myoblasts) and share common specific cell protein expressions and biomarkers.^{8,9,14-19} Also, bone regeneration may be enhanced by other factors, such as the use of fibronectin. Fibronectin is a glycoprotein of extracellular matrix that favors cell adherence, differentiation, and expansion. The use of biomaterials or titanium surfaces coated with fibronectin has shown satisfactory results in bone regeneration processes and osseointegration of dental implants.²⁰⁻²²

The objective of the present experimental study was to assess bone regeneration potential of a ceramic biomaterial (β -tricalcium phosphate, β -TCP) alone or coated with fibronectin or the combination of fibronectin and adipose-derived stem cells (ADSCs) in three-wall critical-size alveolar ridge defects covered with collagen, as compared with a control defect (without biomaterial filling).

MATERIALS AND METHODS

Material

The study was approved by the Ethics Committee on Animal Research (CEEA 227-109) of the University of Barcelona. A total of 18 somatically homogeneous female Beagle dogs in which a quarantine period was previously completed were included in the study. Animals were divided into three study groups and sacrificed at 1 (T1), 2 (T2), and 3 (T3) months postoperatively. Each animal was identified with an ear tattoo and microchip implant.

Surgical Protocol

The surgical protocol was designed into two phases in which animals were submitted to the same anesthetic technique, postoperative analgesia and antibiotic regimens, and aseptic conditions.

Phase 1. The first, second, and third premolars and the first molar of both mandibular hemiarches were extracted under general anesthesia. Dogs were premedicated with acepromazine, 2.5 mg/10 kg subcutaneously (s.c.) (Pharmavet) and atropine sulphate, 0.05 mg/kg s.c. (John Martin). Anesthesia was induced with sodium thiopental, 10 mg/kg intravenously (i.v.) (Pentovet, Richmond Vet Pharma) and inhaled 1.5% to 2% isoflurane (Sofloran, Pisa Agropecuaria) with subsequent endotracheal intubation. Local anesthetic infiltration, 1.8 mL per arch (articaine hydrochloride 4% and epinephrine 1:100,000, Ultracain, Normon) was also administered. Dental extractions were performed

by odontosections to ensure preservation of the outer cortical bone, using round burs No. 6 tungsten carbide mounted handpieces and under constant irrigation with sterile saline. Alveolar mucosa was sutured with 4-0 silk sutures on a curved needle (Aragó). Sutures were removed 10 days later.

Phase 2. After a healing period of 3 months, four cylindrical bone defects ($7 \times 7 \times 7$ mm) were prepared after elevation of a mucoperiosteal flap, using a trephine bur (7 mm outer diameter), causing complete destruction of the buccal cortical plate of the alveolar ridge. Surgically created critical bone defects were similar to those reported by other authors.²³⁻²⁶ The position of the first premolar was assigned to the control group. The three remaining defects were filled at random with (1) 0.25 to 1 mm of particulate β -TCP (KeraOs, Keramat), (2) particulate β -TCP coated with fibronectin (β -TCP-Fn), and (3) particulate β -TCP coated with a combination of fibronectin and ADSCs (β -TCP-Fn-ADSCs) (Fig 1). Defects were then covered with 30×40 -mm bovine collagen membrane (Bio-Gide, Laboratorios INIBSA), and the surgical field was closed by primary intent with 4-0 silk sutures (Aragó).

Postoperative Care. Animals were kept on a soft diet and treated with amoxicillin trihydrate (Clamoxyl, Pfizer), 15 mg/kg intramuscularly (im) every 48 hours, starting 24 hours before surgery (five doses, total 10 days) and 0.2 mg/kg/day of meloxicam (Meloxicam Syntex, Syntex S.A.). Oral hygiene included daily brushing and irrigation with 0.2% aqueous solution of chlorhexidine.

Animals were sacrificed by a lethal dose of anesthetics at T1, T2, and T3. Both hemi-mandibles were dissected and immersed in 40% formaldehyde solution in codified containers for histomorphometric analysis.

Bone Histomorphometry

The samples were processed for study using the technique of embedding in methacrylate described by Donath and Breuner.²⁷ Hemi-mandibles were divided into blocks, taking into account the study areas using the Exakt precision cutting and grinding system (Exakt 400 System, Apparatebau), dehydrated in graded alcohol, and embedded in glycol methacrylate (Technovit 7200 VLC, Heraeus Kulzer). Blocks were then divided along the long axis, and thickness was reduced until approximately 50- μ m study samples were obtained.

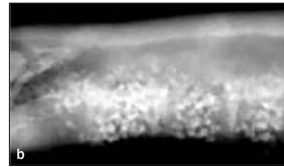
Samples were stained following the method of Jenö and Géza²⁸ and were examined under a light microscope (BX51, Olympus) connected to a camera (DP71, Olympus). Twenty-five images at $\times 40$ ($\times 10$ ocular, $\times 4$ objective) were obtained and assembled using the Olympus Cell^D digital image system (Olympus). Reconstructed images were treated with Adobe Photoshop C

Utilización de células madre adiposas en procesos de regeneración ósea guiada en defectos de tamaño crítico de la cortical vestibular.

Alvira-González et al



Fig 1 (a) Preoperative view of the three study defects filled at random with bone regeneration biomaterial (β -tricalcium phosphate: β -TCP; β -TCP with fibronectin [Fn]: β -TCP-Fn; and β -TCP with a combination of Fn and adipose-derived stem cells [ADSCs]: β -TCP-Fn-ADSCs) and unfilled control defect. (b) Periapical radiographic image of the area after 3 months of healing.



S3 (Adobe Systems), and the areas of biomaterial and bone neoformation were colored (Fig 2). The following study variables were analyzed using the MicroImage 4.0 software (Olympus): surface area of bone regeneration (mm^2), percentage of collapsed surface, percentage of neoformed bone matrix, percentage of medullary space, percentage of particulate biomaterial in relation to the original alveolar ridge area (the mean area of the original alveolar ridge was calculated according to the dimensions of the surgically created defect [Fig 3]), total perimeter of the biomaterial, and percentage of the perimeter of biomaterial in contact with the neoformed bone matrix.

Canine Adipose-Derived Stem Cells

Canine adipose-derived stem cells (cADSCs) were obtained from abdominal subcutaneous adipose tissue following a modified method described by Zuk et al.²⁹ Samples (about 5 g of adipose tissue) were washed intensively with Dulbecco phosphate-buffered saline (DPBS), digested with type I collagenase (0.16 mg/mL, Sigma) at 37°C under shaking for 35 minutes, and centrifuged at 1,200 g for 10 minutes to separate the stromal cell fraction. The pellets were treated with red cell lysing buffer (KO 2HPO4 5.7 mmol/L, NH4CL 155 mmol/L, and EDTA 0.1 mmol/L at pH 7.23) for 10 minutes at room temperature and centrifuged at 750 g for 10 minutes. The final pellet was resuspended in cADSCs proliferative medium (PM) consisting of Dulbecco's modified Eagle's medium (Lonza) supplemented with 10% FBS (Lab Clinic), 2 mmol/L L-glutamine (Lonza), 10 mmol/L Hepes (Lonza), and antibiotics (Lonza). The cell suspension was filtered through a 100- μm mesh (Falcon). Finally, a portion of the cADSCs cells were cryopreserved in cryopreservation medium (90% FBS-10% DMSO), frozen at -80°C in an isopropanol-jacketed closed container, and stored in liquid nitrogen the next day. The other portion of the

cells were resuspended in PM, plated at 1×10^5 cells/ cm^2 in a T75 flask (Nunc) and incubated at 37°C in 5% CO_2 . After 24 hours, samples were washed with DPBS to eliminate nonadhesive cells and kept in a PM. To obtain a large number of cells, cADSCs were further expanded on polystyrene culture flask with PM at a density of 7,000 cells/ cm^2 , and the medium changed three times per week. After one passage, when 80% confluence was achieved, cells were harvested with trypsin-EDTA (Sigma) and used for the characterization experiments.

The isolated cells were seeded at 10,000 cells/ cm^2 and cultivated 21 days at 37°C and 5% CO_2 with PM or osteogenic medium (OM) consisting of PM supplemented with 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ascorbic acid (Sigma), 1 $\mu\text{mol}/\text{L}$ dexamethasone (Sigma) and 10 mmol/L glycerol 2P (Sigma). The osteogenesis was demonstrated by accumulation of mineralized calcium phosphate assessed by alizarin red staining.

Coating of β -TCP with Fibronectin (Fn) and ADSCs

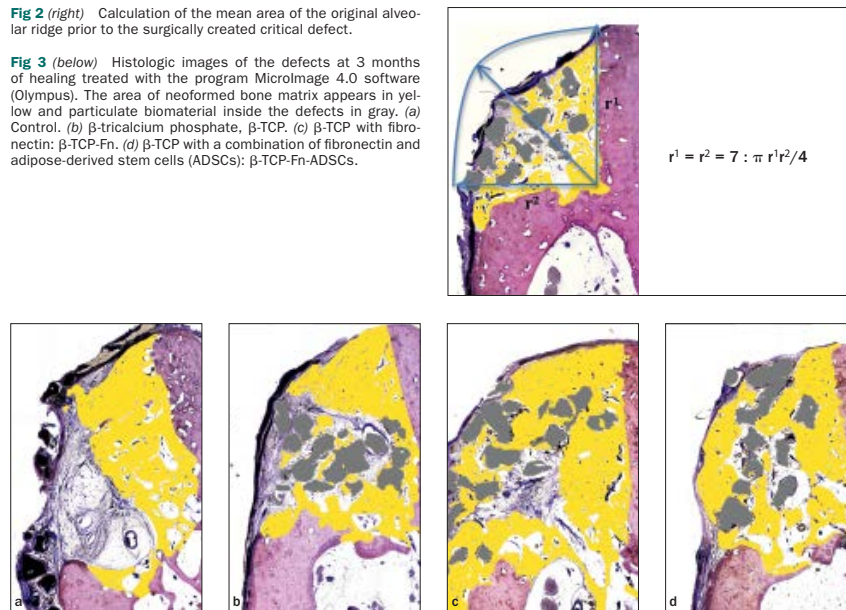
Twenty-four hours before the surgery, 500 μL of fibronectin solution (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in DMEM 1 g/L) was added per gram of bone graft and incubated at 37°C for 24 hours. Finally, the coating solution was eliminated, and the grafts were washed with DPBS. One week before the surgery, the cells were thawed and plated at 1×10^5 cells/ cm^2 in a T75 flask in PM medium and incubated at 37°C in 5% CO_2 . After 24 hours, the samples were washed with DPBS to eliminate nonadhesive cells and kept in a PM. The cells were maintained with PM medium, which was changed three times per week. On the day of surgery, cells were harvested with trypsin-EDTA (Sigma) and seeded on β -TCP bone graft with or without fibronectin coating (5×10^5 cells/1 g β -TCP bone graft). To promote the adhesion, the cells seeded on the bone graft were maintained at 37°C and 5% CO_2 for 2 hours.

198 Volume 31, Number 1, 2016

© 2016 BY QUINTESSENCE PUBLISHING CO, INC. PRINTING OF THIS DOCUMENT IS RESTRICTED TO PERSONAL USE ONLY. NO PART MAY BE REPRODUCED OR TRANSMITTED IN ANY FORM WITHOUT WRITTEN PERMISSION FROM THE PUBLISHER.

Fig 2 (right) Calculation of the mean area of the original alveolar ridge prior to the surgically created critical defect.

Fig 3 (below) Histologic images of the defects at 3 months of healing treated with the program MicroImage 4.0 software (Olympus). The area of neoformed bone matrix appears in yellow and particulate biomaterial inside the defects in gray. (a) Control. (b) β -tricalcium phosphate, β -TCP. (c) β -TCP with fibronectin: β -TCP-Fn. (d) β -TCP with a combination of fibronectin and adipose-derived stem cells (ADSCs): β -TCP-Fn-ADSCs.



Statistical Analysis

The Statistical Package for the Social Sciences (SPSS, SPSS Inc) version 15.0 for Windows was used for the analysis of data. Bone histomorphometric variables were expressed as mean and standard deviation (SD). Differences of histomorphometric variables between the control group and the three study groups (β -TCP, β -TCP-Fn, and β -TCP-Fn-ADSCs) at T1, T2, and T3 were assessed with the analysis of variance (ANOVA), and differences between data at T1, T2, and T3 with the *t* test for paired samples. Statistical significance was set at $P < .05$.

RESULTS

Of the 18 animals included in the study, two were excluded because of dehiscence of the operated area with important loss of regeneration material. Small wound dehiscence occurred in another two animals, which were sutured immediately, minimizing the loss of biomaterial. Therefore, data from 16 animals were analyzed with four

histologic samples for each dog (control, β -TCP, β -TCP-Fn, and β -TCP-Fn-ADSCs), a total of 64 samples, which were grouped according to the euthanasia time (1 month, T1; 2 months, T2; 3 months, T3).

Bone Formation and Degree of Collapse

As shown in Table 1, there were no statistically significant differences in the mean area of bone regeneration (and, therefore, the percentage of collapsed surface) at T1, T2, and T3 time points in all study groups. However, as sacrifice of the animals was delayed, a progressive increase in the bone regeneration area was observed in all groups. Differences were only statistically significant for the group of animals treated with β -TCP-Fn-ADSCs when the bone regeneration area at T3 was compared to T1 (mean [SD] 26.21 [6.22] vs 14.24 [4.51] mm²) ($P = .006$).

Neoformed Bone Matrix and Medullary Space

The percentages of neoformed bone matrix and medullary space in controls and the three study groups at different time points are shown in Table 1.

Utilización de células madre adiposas en procesos de regeneración ósea guiada en defectos de tamaño crítico de la cortical vestibular.

Alvira-González et al

Table 1. Surface Area of Bone Regeneration in the Study Groups According to the Time of Euthanasia

Data	Study groups				P value
	Control	β-TCP	β-TCP-Fn	β-TCP-Fn-ADSCs	
Bone regeneration area, mm², mean (SD)					
T1	15.62 (6.73)	16.77 (6.11)	16.32 (1.85)	14.24 (4.51)*	.875
T2	18.54 (3.78)	19.03 (6.28)	21.71 (4.44)	19.28 (3.47)	.708
T3	24.23 (13.14)	24.55 (7.01)	23.78 (9.64)	26.21 (6.22)*	.972
Collapsed surface, %, mean (SD)					
T1	54.41 (17.5)	56.41 (15.86)	57.58 (4.82)	62.98 (11.74)	
T2	51.81 (9.83)	50.53 (16.31)	43.56 (11.53)	49.89 (9.02)	
T3	37.02 (24.15)	36.20 (18.21)	38.19 (25.05)	31.87 (16.18)	
Neoformed bone matrix, %, mean (SD)					
T1	11.29 [†] (3.42)	14.33 [†] (5.30)	13.03 (3.39)	10.08 (6.24)	.524
T2	20.61 (6.02)	19.97 (7.86)	19.51 [§] (5.36)	12.33 [¶] (1.82)	.115
T3	32.12 (15.25)	30.1 (4.08)	29.6 (11.53)	28.20 (6.59)	.929
Medullary space, %, mean (SD)					
T1	22.52 (8.75)	20.31 (8.01)	21.23 (4.92)	18.92 (7.69)	.891
T2	21.63 (5.88)	15.94 (6.32)	21.17 (5.91)	21.87 (4.79)	.341
T3	22.32 (18.53)	20.48 (7.37)	20.52 (11.18)	25.37 (9.92)	.893
Biomaterial in contact with neoformed bone matrix, %, mean (SD)					
T1	NA	31.43 (16.10)	22.78 (9.69)	16.50 (14.48)	.263
T2	NA	27.95 (3.49)	28.71 (17.42)	20.03 (11.02)	.475
T3	NA	41.48 (13.63)	43.95 (21.26)	27.33 (19.73)	.275

NA = not applicable.

* $P = .006$; [†] $P < .05$ for the comparison of T1 vs T2 and T1 vs T3; [‡] $P < .01$ for the comparison of T1 vs T3 and $P < .05$ for the comparison of T2 vs T3; [§] $P < .05$ for the comparison of T1 vs T3; [¶] $P < .01$ for the comparison of T1 vs T3 and T2 vs T3.

When data from controls and the three biomaterials (β-TCP, β-TCP-Fn, and β-TCP-Fn-ADSCs) at T1, T2, and T3 euthanasia times were compared, statistically significant differences were not found. However, the percentage of neoformed bone matrix increased significantly in all study groups as sacrifice of the animals was delayed (Table 1).

Biomaterial, Biomaterial Perimeter, and Biomaterial in Contact with Neoformed Bone Matrix

A total of 81.2% ($n = 13$) of control defects showed some degree of contamination with particles from the adjacent defects (mean contamination area of 2.69 mm² accounting for 6.98% of the bone regeneration area). However, significant differences in the degree of contamination of control defects at the different time points (T1, T2, T3) were not found. Also, the amount of particulate biomaterial was similar in the β-TCP, β-TCP-Fn, and β-TCP-Fn-ADSCs groups ($P = .961$, $P = .824$, and $P = .822$, respectively) and at T1 ($P = .483$), T2 ($P = .234$), and T3 ($P = .217$) time points. In relation to the total perimeter of biomaterial, similar

findings were obtained in the β-TCP, β-TCP-Fn, and β-TCP-Fn-ADSCs groups ($P = .948$, $P = .901$, and $P = .814$, respectively) and at T1 ($P = .455$), T2 ($P = .222$), and T3 ($P = .182$) time points. The percentage of biomaterial in contact with the neoformed bone matrix did not show significant differences considering the type of coating and the euthanasia time (Table 1).

DISCUSSION

The use of mesenchymal stem cells for regenerative purposes has been shown to be a predictable and promising technique, with reconstruction of critical defects of the arches as the main objective in the field of oral surgery and implantology.²⁻⁵ Differentiation of mesenchymal stem cells into osteoblasts takes advantage of osteoinduction and osteoconduction properties of autologous bone grafting, avoiding the need to use a donor area and harvesting autogenous bone grafts.^{11,19,29,30} More recently, much interest has developed in the use of ADSC, with similar differentiation capabilities to bone marrow cells and

200 Volume 31, Number 1, 2016

© 2016 BY QUINTESSENCE PUBLISHING CO, INC. PRINTING OF THIS DOCUMENT IS RESTRICTED TO PERSONAL USE ONLY. NO PART MAY BE REPRODUCED OR TRANSMITTED IN ANY FORM WITHOUT WRITTEN PERMISSION FROM THE PUBLISHER.

the benefits that can be easily harvested and cultured.^{9,15,19} Tissue engineering technology in combination with marrow-derived mesenchymal stem cells have been successfully used for alveolar bone regeneration.³¹⁻³⁵ Several authors^{33,36-38} underlined the favorable results of bone marrow stem cell-scaffold constructs to regenerate bone in significant osseous defects as compared with scaffolds without stem cells, with bone formation indexes similar to those obtained with autografts.³⁷⁻³⁹

However, much controversy exists as to how stem cells efficiently differentiate and regenerate,^{7-9,17} as well as how stem cell origin affects optimal differentiation and regeneration.^{16,19,40} Although ADSCs differentiate directly into osteoblasts less often than do bone marrow stem cells, the total amount of regenerated bone is almost the same.⁴¹ Moreover, experimental studies support the efficiency of mesenchymal stem cells derived from adipose tissue, perosteum, or umbilical cord blood for regeneration of bone defects.^{42,43}

Tissue-engineered bone regeneration using ADSCs provides an acceptable alternative to autologous bone graft,^{9,17,40,44} but the regenerative capacity of ADSCs does not seem to be superior to autologous bone or other bone substitutes in the same conditions, as the authors found in the present study. A combination of β -TCP-Fn-ADSCs was used as a positive control instead of β -TCP-ADSCs because of the limited benefits seen in the results previously obtained by other authors when comparing adipose stem cells alone (or with a scaffold) over other bone substitutes or bone marrow stem cells.⁴⁵⁻⁴⁷ In addition, the size of the defects and the space available in the hemi-mandible limited the number of study groups, considering β -TCP-Fn-ADSCs as a more valuable group. The other hemi-mandible was used for another study, whose results will be reported shortly. In a canine maxillary alveolar cleft model, Pourebrahim et al⁴⁵ showed less bone formation of ADSCs seeded onto hydroxyapatite/ β -tricalcium phosphate-coated scaffolds than autografts. In the study of reconstruction of rat calvaria defects, Bohnenblust et al⁴⁶ showed that the presence of osteogenic differentiated adipose stromal cells did not increase overall bone density compared with bone graft only. Han et al⁴⁷ in cranial defects in rabbits, did not show differences in bone regeneration between ADSCs, demineralized bone matrix (DBM), and the use of ADSCs and DBM together. In the present study, a ceramic biomaterial coated with ADSCs (β -TCP-Fn-ADSCs) was not associated with a higher amount of neofomed bone matrix as compared with other particulate biomaterials (β -TCP or β -TCP-Fn) or control defects in each of the T1, T2, and T3 study times. However, although there was a significant increase in bone formation as

the healing was more advanced, this process was not homogeneous in all groups, with significant increases at 2 months after surgery in controls and at 3 months in β -TCP and β -TCP-Fn-ADSCs. The β -TCP-Fn group showed a progressive increase in neofomed bone matrix, with significant differences between animals sacrificed at 1 and 3 months of healing.

The use of agents as transfer vehicles of stem cells may have a positive effect in the process of bone regeneration of critical defects as well as acting as an osteoconductor element.⁴⁷ Promising experiences have been reported with the combination of stem cells with platelet-rich plasma (PRP),^{32,48} fibrin glue,^{41,47,49,50} polylactic acid (PLA) polymers,^{51,52} synthetic extracellular matrices,⁵³ or the use of allogeneic^{47,54} or synthetic^{33,37} bone substitutes. Tricalcium phosphate appears to be a biomaterial of choice for tissue-engineered bone regeneration because of its properties of biocompatibility, high conductivity, and lack of immunogenicity.^{33,35,37,55,56} Although there is insufficient evidence of the ideal biocompatible scaffold, frequently related to the defect size, tricalcium phosphate combined with stem cells has shown satisfactory results in the treatment of bone defects.^{33,37,57}

Contamination of control defects with regenerative material from adjacent bone defects, probably due to the use of particulate biomaterial, is a limitation of the study. Khoshzaban et al⁵⁷ suggested that the material of the experimental defect got transferred to its adjacent empty defect from circulation and animal movement, especially at the operation area, after periosteal approximation. Takahashi et al²⁴ concluded that the use of β -TCP and a collagen sponge could provide better intraoral manipulation capability than TCP granules alone, being particularly indicated in alveolar preservation procedures in bone defects with buccal dehiscence.

Other authors, such as Mankani et al,⁵⁶ have shown that the size of the particles within bone marrow stromal cells appears to determine the extent of bone formation, with particles of 0.1 to 0.25 mm size demonstrating the greatest bone formation. In the present study, the use of biomaterial of higher particle size (between 0.25 and 1 mm) together with a high rate of contamination (80%) of control defects may be confounding factors for the lack of statistically significant differences in neofomed bone matrix between particulate biomaterial-treated defects (β -TCP, β -TCP-Fn, and β -TCP-Fn-ADSCs) and controls.

Fibronectin is an extracellular matrix glycoprotein that promotes cell adhesion, differentiation, and expansion. Jo et al⁵⁸ showed that fibronectin in combination with a xenograft or a ceramic biomaterial (calcium phosphate) have a favorable effect on cell adhesion, especially within the first hours

Utilización de células madre adiposas en procesos de regeneración ósea guiada en defectos de tamaño crítico de la cortical vestibular.

Alvira-González et al

after culture. The adhesion-promoting property of fibronectin is particularly relevant in regeneration procedures of bone defects favoring adhesion of stem cells or osteoblasts when combined with some biomaterials.^{20,51,59,60} In the present study, the use of a particulate β -TCP biomaterial coated with fibronectin or a combination of fibronectin and ADSCs was not associated with a better outcome in terms of bone formation or total area of bone regeneration as compared with the other study groups (β -TCP alone and controls). However, it should be noted that only bone defects treated with β -TCP-Fn-ADSCs showed a significant increase in bone regeneration area as the period of the healing process increased. This enhancing effect of fibronectin on bone regeneration processes together with inherent properties of adipose stem cells may contribute to stabilize the regenerated tissue more rapidly, counteracting compression forces of surrounding soft tissue, with a space-maintaining effect that prevents collapse of critical defects. However, given that studies using a similar model of ADSCs have not been previously reported, comparative data are lacking.

CONCLUSIONS

The use of ADSCs in bone regeneration processes of critical-size defects of the alveolar ridge did not entail an advantage regarding greater bone regeneration as compared with other biomaterials. However, the use of β -TCP coated with a combination of fibronectin and ADSCs appeared to favor stabilization of the regenerated area, allowing a more efficient maintenance of the space at 3 months of healing. The heterogeneity of experimental models in bone regeneration procedures using stem cells of different origins is an important drawback in the assessment of the advantages of the different scaffolds as well as determining the most adequate construct for each type of defect. Further studies are needed to determine the osteogenic ability of ADSCs in the reconstruction of bony defects.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are indebted to Alvaro Gimeno, MVSc, Head of the Animal Facility at Bellvitge Health Science Campus, University of Barcelona, for his valuable contribution to the care of the experimental animals, and Marta Pulido, MD, for editing the manuscript and editorial assistance. The authors also are grateful to Drs Javier Mir Marí, Lluís Aznar Arasa, and Marwan Nar for their help in both surgical phases of the study. The authors declare that they do not have any conflict of interest. This study was performed by the "Dental and Maxillofacial Pa-

thology and Therapeutic" Research Group of the UB-IDIBELL Institute with the economic support of an educational-clinical agreement in Oral Surgery between the University of Barcelona, General Health Consortium, and the Catalan Health Service of the Autonomous Government of Catalonia.

REFERENCES

1. Araújo MG, Lindhe J. Dimensional ridge alterations following tooth extraction. An experimental study in the dog. *J Clin Periodontol* 2005;32:212–218.
2. Khojasteh A, Behnia H, Dashti SG, Stevens M. Current trends in mesenchymal stem cell application in bone augmentation: A review of the literature. *J Oral Maxillofac Surg* 2012;70:972–982.
3. Petrovic V, Zivkovic P, Petrovic D, Stefanovic V. Craniofacial bone tissue engineering. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 2012;114:e1–e9.
4. Zaky SH, Cancedda R. Engineering craniofacial structures: Facing the challenge. *J Dent Res* 2009;88:1077–1091.
5. Machado E, Fernandes MH, Gomes Pde S. Dental stem cells for craniofacial tissue engineering. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 2012;113:728–733.
6. Ward BB, Brown SE, Krebsbach PH. Bioengineering strategies for regeneration of craniofacial bone: A review of emerging technologies. *Oral Dis* 2010;16:709–716.
7. De Ugarte DA, Alfonso Z, Zuk PA, et al. Differential expression of stem cell mobilization-associated molecules on multi-lineage cells from adipose tissue and bone marrow. *Immunol Lett* 2003;89:267–270.
8. Hattori H, Sato M, Masuoka K, et al. Osteogenic potential of human adipose tissue-derived stromal cells as an alternative stem cell source. *Cells Tissues Organs* 2004;178:2–12.
9. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* 2002;13:4279–4295.
10. Soltan M, Smiler D, Soltan C. The inverted periosteal flap: A source of stem cells enhancing bone regeneration. *Implant Dent* 2009;18:373–379.
11. Ito K, Yamada Y, Nakamura S, Ueda M. Osteogenic potential of effective bone engineering using dental pulp stem cells, bone marrow stem cells, and periosteal cells for osseointegration of dental implants. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2011;26:947–954.
12. Honda MJ, Imaizumi M, Suzuki H, et al. Stem cells isolated from human dental follicles have osteogenic potential. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2011;111:700–708.
13. Srouji S, Ben-David D, Lotan R, et al. The innate osteogenic potential of the maxillary sinus (Schneiderian) membrane: An ectopic tissue transplant model simulating sinus lifting. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2010;39:793–801.
14. Zuk PA. Adipose-derived stem cells in tissue regeneration: A review. *ISRN Stem Cells* 2013; 713959. doi:10.1155/2013/713959.
15. Zhu Y, Liu T, Song K, et al. Adipose-derived stem cell: A better stem cell than BMSC. *Cell Biochem Funct* 2008;26:664–675.
16. Im GI, Shin YW, Lee KB. Do adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have the same osteogenic and chondrogenic potential as bone marrow-derived cells? *Osteoarthritis Cartilage* 2005;13:845–853.
17. De Ugarte DA, Morizono K, Elbarbary A, et al. Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow. *Cells Tissues Organs* 2003;174:101–109.
18. Barba M, Cicione C, Bernardini C, Michetti F, Lattanzi W. Adipose-derived mesenchymal cells for bone regeneration: State of the art. *Biomed Res Int* 2013;416391. doi: 10.1155/2013/416391. [Epub ahead of print]
19. Hayashi O, Katsube Y, Hirose M, Ohgushi H, Ito H. Comparison of osteogenic ability of rat mesenchymal stem cells from bone marrow, periosteum, and adipose tissue. *Calcif Tissue Int* 2008;82:238–247.
20. Park JM, Koak JY, Jang JH, et al. Osseointegration of anodized titanium implants coated with fibroblast growth factor-fibronectin (FGF-FN) fusion protein. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2005;21: 859–866.

202 Volume 31, Number 1, 2016

© 2016 BY QUINTESSENCE PUBLISHING CO, INC. PRINTING OF THIS DOCUMENT IS RESTRICTED TO PERSONAL USE ONLY. NO PART MAY BE REPRODUCED OR TRANSMITTED IN ANY FORM WITHOUT WRITTEN PERMISSION FROM THE PUBLISHER.

Utilización de células madre adiposas en procesos de regeneración ósea guiada en defectos de tamaño crítico de la cortical vestibular.

Alvira-González et al

21. Rivera-Chacon DM, Alvarado-Velez M, Acevedo-Morantes CY, et al. Fibronectin and vitronectin promote human fetal osteoblast cell attachment and proliferation on nanoporous titanium surfaces. *J Biomed Nanotechnol* 2013;9:1092–1097.
22. Rapuano BE, Hackshaw KM, Schniepp HC, MacDonald DE. Effects of coating a titanium alloy with fibronectin on the expression of osteoblast gene markers in the MC3T3 osteoprogenitor cell line. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2012;27:1081–1090.
23. von Arx T, Cochran DL, Hermann JS, Schenk RK, Buser D. Lateral ridge augmentation using different bone fillers and barrier membrane application. A histologic and histomorphometric pilot study in the canine mandible. *Clin Oral Implants Res* 2001;12:260–269.
24. Takahashi Y, Marukawa E, Omura K. Application of a new material (β -TCP/Collagen Composites) in extraction socket preservation: An experimental study in dogs. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2013; 28:444–452.
25. Lee JS, Ko SH, Kim YT, Jung UW, Choi SH. Guided bone regeneration using cyanoacrylate-combined calcium phosphate in a dehiscence defect: A histologic study in dogs. *J Oral Maxillofac Surg* 2012;70: 2070–2079.
26. Li X, Wang X, Zhao T, et al. Guided bone regeneration using chitosan-collagen membranes in dog dehiscence-type defect model. *J Oral Maxillofac Surg* 2014;72:1–14.
27. Donath K, Breuner G. A method for the study of undecalcified bones and teeth with attached soft tissues. The Säge-Schliff (sawing and grinding) technique. *J Oral Pathol Med* 1982;11:318–326.
28. Jenö L, Géza L. A simple differential staining method for semi-thin sections of ossifying cartilage and bone tissues embedded in epoxy resin. *Mikroskopie* 1975;31:1–4.
29. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: Implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 2001;7:211–228.
30. Robey PG, Bianco P. The use of adult stem cells in rebuilding the human face. *J Am Dent Assoc* 2006;137:961–972.
31. Handschel J, Naujoks C, Depprich R, et al. Embryonic stem cells in scaffold-free three-dimensional cell culture: Osteogenic differentiation and bone generation. *Head Face Med* 2011;7:12.
32. Yamada Y, Ueda M, Hibi H, Nagasaka T. Translational research for injectable tissue-engineered bone regeneration using mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma: From basic research to clinical case study. *Cell Transplant* 2004;13:343–355.
33. Jafarian M, Eslaminejad MB, Khojasteh A, et al. Marrow-derived mesenchymal stem cells-directed bone regeneration in the dog mandible: A comparison between biphasic calcium phosphate and natural bone mineral. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2008;105:14–24.
34. De Kok IJ, Peter SJ, Archambault M, et al. Investigation of allogeneic mesenchymal stem cell-based alveolar bone formation: Preliminary findings. *Clin Oral Implants Res* 2003;14:481–489.
35. De Kok IJ, Drapeau SJ, Young R, Cooper LF. Evaluation of mesenchymal stem cells following implantation in alveolar sockets: A canine safety study. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2005;20:511–518.
36. Ito K, Yamada Y, Naiki T, Ueda M. Simultaneous implant placement and bone regeneration around dental implants using tissue-engineered bone with fibrin glue, mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma. *Clin Oral Implants Res* 2006;17:579–586.
37. Yuan J, Cui L, Zhang WJ, Liu W, Cao Y. Repair of canine mandibular bone defects with bone marrow stromal cells and porous beta-tricalcium phosphate. *Biomaterials* 2007;28:1005–1013.
38. Khojasteh A, Eslaminejad MB, Nazarian H. Mesenchymal stem cells enhance bone regeneration in rat calvarial critical size defects more than platelet-rich plasma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2008;106:356–362.
39. Yamada Y, Ueda M, Naiki T, et al. Autogenous injectable bone for regeneration with mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma: Tissue engineered bone regeneration. *Tissue Eng* 2004;10:955–964.
40. Zaminy A, Ragerdi Kashani I, Barbarestani M, et al. Osteogenic differentiation of rat mesenchymal stem cells from adipose tissue in comparison with bone marrow mesenchymal stem cells: Melatonin as a differentiation factor. *Iran Biomed J* 2008;12:133–141.
41. Han DS, Chang HK, Kim KR, Woo SM. Consideration of bone regeneration effect of stem cells: Comparison of bone regeneration between bone marrow stem cells and adipose-derived stem cells. *J Craniofac Surg* 2014;25:196–201.
42. Stockmann P, Park J, von Wilmsowky C, et al. Guided bone regeneration in pig calvarial bone defects using autologous mesenchymal stem/progenitor cells—a comparison of different tissue sources. *J Craniofac Surg* 2012;40:310–320.
43. Kang BJ, Ryu HH, Park SS, et al. Comparing the osteogenic potential of canine mesenchymal stem cells derived from adipose tissues, bone marrow, umbilical cord blood, and Wharton's jelly for treating bone defects. *J Vet Sci* 2012;13:299–310.
44. Streckbein P, Jäckel S, Malik CY, et al. Reconstruction of critical-size mandibular defects in immunoincompetent rats with human adipose-derived stromal cells. *J Craniofac Surg* 2013;41:496–503.
45. Pourebrahimi N, Hashemibeni B, Shahnasari S, et al. A comparison of tissue-engineered bone from adipose-derived stem cell with autogenous bone repair in maxillary alveolar cleft model in dogs. *J Oral Maxillofac Surg* 2013;42:562–568.
46. Bohnenblust ME, Steigelman MB, Wang Q, Walker JA, Wang HT. An experimental design to study adipocyte stem cells for reconstruction of calvarial defects. *J Craniofac Surg* 2009;20:340–346.
47. Han DS, Chang HK, Park JH, Kim KR, Woo SM. Consideration of bone regeneration effect of stem cells: Comparison between adipose-derived stem cells and demineralized bone matrix. *J Craniofac Surg* 2014;25:189–195.
48. Yamada Y, Ueda M, Naiki T, Nagasaka T. Tissue-engineered injectable bone regeneration for osseointegrated dental implants. *Clin Oral Implants Res* 2004;15:589–597.
49. Hayashi O, Katsube Y, Hirose M, Ohgushi H, Ito H. Comparison of osteogenic ability of rat mesenchymal stem cells from bone marrow, periosteum, and adipose tissue. *Calcif Tissue Int* 2008;82:238–247.
50. Lee LT, Kwan PC, Chen YF, Wong YK. Comparison of the effectiveness of autologous fibrin glue and macroporous biphasic calcium phosphate as carriers in the osteogenesis process with or without mesenchymal stem cells. *J Chin Med Assoc* 2008;71:66–73.
51. Di Bella C, Farlie P, Penington AJ. Bone regeneration in a rabbit critical-sized skull defect using autologous adipose-derived cells. *Tissue Eng Part A* 2008;14:483–490.
52. El-Amin SF, Lu HH, Khan Y, et al. Extracellular matrix production by human osteoblasts cultured on biodegradable polymers applicable for tissue engineering. *Biomaterials* 2003;24:1213–1221.
53. Yoshimi R, Yamada Y, Ito K, et al. Self-assembling peptide nanofiber scaffolds, platelet-rich plasma, and mesenchymal stem cells for injectable bone regeneration with tissue engineering. *J Craniofac Surg* 2009;20:1523–1530.
54. Cornejo A, Sahar DE, Stephenson SM, et al. Effect of adipose tissue-derived osteogenic and endothelial cells on bone allograft osteogenesis and vascularization in critical-sized calvarial defects. *Tissue Eng Part A* 2012;18:1552–1561.
55. Bose S, Tarafder S. Calcium phosphate ceramic systems in growth factor and drug delivery for bone tissue engineering: A review. *Acta Biomater* 2012;8:1401–1421.
56. Mankani MH, Kuznetsov SA, Fowler B, Kingman A, Robey PG. In vivo bone formation by human bone marrow stromal cells: Effect of carrier particle size and shape. *Biotechnol Bioeng* 2001;72:96–107.
57. Khoshzaban A, Mehrzad S, Tavakoli V, et al. The comparative effectiveness of demineralized bone matrix, beta-tricalcium phosphate, and bovine-derived anorganic bone matrix on inflammation and bone formation using a paired calvarial defect model in rats. *Clin Cosmet Investig Dent* 2011;3:69–78.
58. Jo YJ, Kim KH, Koo KT, et al. Initial adhesion of bone marrow stromal cells to various bone graft substitutes. *J Periodontol Implant Sci* 2011;41:67–72.
59. Bruder SP, Kurth AA, Shea M, et al. Bone regeneration by implantation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 1998;16:155–162.
60. Lee SJ, Lim GJ, Lee JW, Atala A, Yoo JJ. In vitro evaluation of a poly(lactide-co-glycolide)-collagen composite scaffold for bone regeneration. *Biomaterials* 2006;27:3466–3472.

The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants 203

© 2016 BY QUINTESSENCE PUBLISHING CO, INC. PRINTING OF THIS DOCUMENT IS RESTRICTED TO PERSONAL USE ONLY. NO PART MAY BE REPRODUCED OR TRANSMITTED IN ANY FORM WITHOUT WRITTEN PERMISSION FROM THE PUBLISHER.