

UNIVERSIDAD DE OVIEDO

**Departamento de Cirugía y
Especialidades Médico-Quirúrgicas**

TESIS DOCTORAL

**REGENERACION ÓSEA EN RATAS ATÍMICAS
MEDIANTE EL EMPLEO DE CÉLULAS MADRE
MESENQUIMALES ADIPOSAS HUMANAS
DIFERENCIADAS IN VITRO A OSTEOLASTOS SOBRE
SCAFFOLDS DE SUERO HUMANO Y
GLUTARALDEHÍDO**

JORGE A. DEL CAMPO CANO

DIRECTORES

**Dr. Prof. D. JUAN CARLOS DE VICENTE RODRÍGUEZ
Dr. D. IGNACIO PEÑA GONZÁLEZ**

2017



RESUMEN DEL CONTENIDO DE TESIS DOCTORAL

1.- Título de la Tesis	
Español: Regeneración ósea en ratas atímicas mediante el empleo de células madre mesenquimales adiposas humanas diferenciadas in vitro a osteoblastos sobre scaffolds de suero humano y glutaraldehído	Inglés: Bone regeneration in athymic mice by using adipose mesenchymal stem cells human in vitro differentiated to osteoblasts on scaffolds of human serum and glutaraldehyde.
2.- Autor	
Nombre: Jorge A. del Campo Cano	DNI/Pasaporte/NIE: E
Programa de Doctorado: Comportamiento de los Biomateriales en las diversas especialidades Médico Quirúrgicas.	
Órgano responsable: DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA Y ESPECIALIDADES MÉDICO QUIRÚRGICAS	

RESUMEN (en español)

Los objetivos eran: aislar y expandir células madre adultas mesenquimales a partir de pequeños fragmentos de tejido adiposo humano, que posteriormente se diferencian a osteoblastos in vitro; obtener tejido osteoide in vitro empleando scaffolds de sueroglutaraldehído con ese tipo de células diferenciadas; establecer la presencia de hueso humano en defectos críticos mandibulares en ratas atímicas, tratados con los constructos de células osteoblásticas obtenidas y sobre los scaffolds indicados; por último, establecer el grado de osificación a las 45 y 90 días del tratamiento de esos defectos críticos.

Para ello se aislaron células madre mesenquimales a partir de muestras de tejido adiposo humano, y posteriormente se caracterizaron mediante el empleo de CD34, CD73, CD90, CD105 y CD45 por citometría de flujo. Se diferenciaron in vitro a células osteoblásticas y se comprobó este hecho mediante fosfatasa alcalina y microanálisis de fósforo y calcio. Se realizaron defectos críticos mandibulares en ratas atímicas de forma bilateral; uno de los lados fue el defecto control, y el otro defecto recibió el tratamiento con las células madre mesenquimales diferenciadas a osteoblastos junto con los scaffolds de suero humano y glutaraldehído. Se establecieron dos tipos de grupos de animales: unos con el scaffold exclusivamente, y otros, con los constructos células-scaffolds. En total, resultaron 6 grupos de estudio (grupo con tratamiento con scaffold, otro con tratamiento con scaffold y células, y otro sin tratamiento).

Estos grupos se encuadraron en dos períodos de seguimiento distintos, de 45 y 90 días.

Tras los citados períodos, se analizó la regeneración de los defectos mediante un estudio de imagen y densitométrico con micro TC.

Se completó un estudio histológico, a través de hematoxilina-eosina y von Kossa, e inmunohistoquímico, mediante STRO-1 y vimentina humana.

Objetivos alcanzados:

- 1- Aislar y expandir células madre adultas mesenquimales a partir de pequeños fragmentos de tejido adiposo humano.
- 2- Diferenciar células madre adultas mesenquimales procedentes de tejido adiposo humano a células osteoblásticas in vitro.



- 3- **Obtener tejido osteoide in vitro empleando scaffolds de suero-glutaraldehído con células osteoblásticas diferenciadas a partir de células madre mesenquimales procedentes de tejido adiposo.**
- 4- **Establecer la presencia de hueso humano en los defectos críticos mandibulares de ratas atímicas, tratados con constructos de células osteoblásticas, obtenidas por diferenciación in vitro de células madre adultas mesenquimales procedentes de tejido adiposo sobre scaffolds de suero humano y glutaraldehído.**

RESUMEN (en Inglés)

The aims were: to isolate and expand adult mesenchymal stem cells from small fragments of human adipose tissue, later differentiated in vitro into osteoblasts; to obtain osteoid tissue in vitro by means of human serum-glutaraldehyde scaffolds with said differentiated cells; to establish the presence of human bone in critical mandibular defects in athymic mice, treated with the obtained osteoblastic cells constructs and on said scaffolds; to establish the degree of bone formation 45 and 90 days after treatment.

MSCs were isolated from human adipose tissue samples, characterised for CD34, CD73, CD90, CD105 and CD45 by flow cytometry, and differentiated in vitro into osteoblasts. To verify this, alkaline phosphatase was measured and a microanalysis of phosphorus and calcium was performed. Critical mandibular defects were performed bilaterally in athymic mice; one of the sides as control, the other receiving treatment with the osteoblasts obtained from differentiated MSCs, together with the human serum- glutaraldehyde scaffolds. Two kinds of groups were established: the first, exclusively with scaffolding, the second, with the cells and scaffolding constructs. There were in all six study groups (scaffolding-treated group, cells and scaffolding-treated group, non-treated group).

These groups were followed up for two periods, 45 and 90 days.

Afterwards, the regeneration of the defects was analysed by image and densitometry examination with μ CT.

A histological study was completed by means of hematoxylin-eosin and von Kossa staining, and a immunohistochemical one, by means of STRO-1 and human vimentin.

The achieved aims were as follows:

1. Isolating and expanding MSCs from small fragments of human adipose tissue.
2. Differentiating in vitro said MSCs into osteoblasts.
3. From said osteoblasts, obtaining in vitro osteoid tissue by means of cells and scaffolding constructs used on mandibular defects in mice.
4. Establishing the presence of human bone in said defects.

ÍNDICE

0. Abreviaturas	3
1. Introducción.....	4
1.1. Antecedentes históricos	5
1.2. Estado actual	6
2. Hipótesis	11
3. Objetivos.....	11
4. Material y método.....	12
4.1. Cultivo de las hASC	12
4.2. Caracterización de las hASC mediante citometría de flujo	13
4.3. Construcción del scaffold	13
4.4. Cultivo secundario	14
4.5. Diferenciación de hASC en células osteogénicas (AiOs).....	15
4.6. Análisis estructural de los cultivos secundarios mediante microscopía electrónica de barrido	15
4.7. Evaluación in vitro de la capacidad osteogénica	15
4.8. Evaluación del depósito mineral in vitro	16
4.9. Procedimiento con un modelo animal	16
4.10. Valoración macroscópica de la regeneración ósea	19
4.11. Evaluación histológica de las muestras	19
4.12. Análisis inmunohistoquímico	19
4.13. Cuantificación del hueso neoformado mediante μ CT y análisis estadístico	20
5. Resultados.....	21
5.1. Resultados in vitro	21
5.1.1. Caracterización molecular por citometría de flujo	21
5.1.2. Detección temprana de osteogénesis	22

5.1.3. Tinción Von Kossa de los cultivos secundarios.....	24
5.1.4. Microestructura del <i>scaffold</i> y morfología de las células por análisis MEB	24
5.2. Resultados in vivo	26
5.2.1. Evaluación macroscópica de los resultados	26
5.2.2. Evaluación histológica de las muestras	27
45 días y AiOs-scaffolds:	27
90 días y AiOs-scaffolds:	28
Solo scaffold:.....	29
5.2.3. Valoración de la existencia de mineralización en el defecto	30
5.2.4. Análisis inmunohistoquímico de las muestras	31
5.2.5. Análisis de la imagen en μ CT	32
4.2.5. Cuantificación y análisis estadístico del grado de mineralización	33
6. Discusión.....	34
7. Conclusiones	40
8. Bibliografía	41

0. ABREVIATURAS

AIn	Alendronato
ALP	Fosfatasa alcalina (<i>alkaline phosphatase</i>)
ASBMR	American Society for Bone and Mineral Research (Sociedad Estadounidense para la Investigación Ósea y Mineral)
ASC	Células madre derivadas de tejido adiposo (<i>adipose-derived stem cells</i>)
BMI	Índice de masa corporal (<i>body mass index</i>)
BM-MSC	Células madre mesenquimales procedentes de médula ósea (<i>bone marrow-mesenchymal stem cells</i>)
BMP	Proteínas morfogenéticas (<i>bone morphogenic proteins</i>)
β-TCP	Beta fosfato tricálcico
CFU	Unidad formadora de colonias (<i>colony-forming unit</i>)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMO	Densidad mineral ósea
HA	Hidroxiapatita
MO	Médula ósea
MSC	Células madre mesenquimales (<i>mesenchymal stem cells</i>)
pASC	Células madre derivadas de tejido adiposo porcino (<i>porcine adipose-derived stem cells</i>)
PBS	Solución salina tamponada con fosfato (<i>phosphate buffered saline</i>)
PD-MSC	Células madre mesenquimales procedentes del periostio
PLGA	Ácido poliláctico-co-glicólico
rBMD	Densidad mineral ósea en ratas (<i>bone mineral density in rats</i>)
MEB	Microscopía electrónica de barrido
PRP	Plasma rico en plaquetas
SFB	Suero fetal bovino
TCP	Fosfato tricálcico
μCT	micro-tomografía computerizada

1. INTRODUCCIÓN

El hueso es un tejido que se renueva sin cesar gracias a un proceso denominado *remodelación ósea*, suficiente para reparar fracturas o pequeños defectos óseos. Sin embargo, cuando estos defectos son de gran tamaño, la remodelación no basta por sí sola para regenerar el tejido ausente.

La pérdida ósea se produce por diversas causas: traumatismos, cirugía oncológica craneofacial y cirugía dentoalveolar, así como por malformaciones congénitas y deformidades del desarrollo. Cuando la pérdida de tejido es demasiado grande, es preciso recurrir a hueso autólogo, sustitutos o derivados óseos. Entre las soluciones clásicas, se encuentra el injerto de hueso autólogo, que puede combinarse o no con sustitutos derivados de hueso o sintéticos (Drosse et al., 2008). Aunque estos planteamientos suelen producir buenos resultados, también implican riesgos, posibles complicaciones y morbilidad de las zonas donantes. Para evitar estos problemas, la ingeniería de tejidos, a partir de células troncales, podría suponer una alternativa válida y segura.

De manera general y muy sucinta, podemos clasificar los injertos en función de su origen en:

- Autoinjerto (o injerto autólogo): en el caso de que el hueso recogido sea del propio paciente; es decir, donante y receptor sean la misma persona.
- Aloinjerto: en el caso de que donante y receptor sean de la misma especie, pero no relacionados genéticamente (hueso humano desmineralizado liofilizado).
- Homoinjerto (o isoinjerto): en el caso de que donante y receptor, además de pertenecer a la misma especie, estén relacionados genéticamente, como ocurre con los gemelos monocigóticos.
- Xenoinjerto: en el caso de que donante y receptor sean de especies diferentes (por ejemplo, si se usa hueso animal desproteínizado).
- Alopástico: en el caso de que se recurra a materiales similares al hueso; por ejemplo, fosfatos tricálcicos, distintos materiales cerámicos, sulfatos de calcio, etcétera.

De todos ellos, los injertos óseos autólogos son el tratamiento de referencia en regeneración ósea, pues pueden actuar por los siguientes mecanismos: *osteoconducción*, ya que aportan el entramado mineralizado necesario para la colonización y proliferación celular; *osteoinducción*, porque mantienen las propiedades necesarias para la diferenciación y proliferación celular; y *osteogénesis*, puesto que aportan células osteogénicas con capacidad proliferativa, que darán lugar a los osteoblastos productores de hueso. Sin embargo, todos

estos procedimientos llevan implícitos riesgos para los pacientes: por ejemplo, morbilidad y posibles secuelas de la zona dadora, cirugías más largas y complejas, con posibilidad de requerir anestesia general e, incluso, ingreso hospitalario.

Una alternativa potencialmente menos lesiva para el paciente es el empleo de técnicas de ingeniería tisular. La medicina regenerativa tiene como objetivos perfeccionar la reparación tisular y regenerar los tejidos combinando el uso de factores de crecimiento, biomateriales y células troncales (Butler, Goldstein y Guilak, 2000).

El objetivo del presente trabajo es estudiar la viabilidad del empleo de técnicas de regeneración tisular basadas en cultivos de MSC procedentes de tejido adiposo humano (hASC) en combinación con *scaffolds* de suero humano y glutaraldehído.

1.1. ANTECEDENTES HISTÓRICOS

Las células troncales mesenquimales (MSC) fueron descritas por primera vez por Friedenstein, Chailakhjan y Lalykina (1970). A partir de extractos de médula ósea (MO) de adultos, describieron sus características, entre las que se encontraban: su capacidad para adherirse al plástico de cultivo; su capacidad de proliferar durante tiempo indefinido sin modificar su fenotipo; su aspecto similar a los fibroblastos y su capacidad para diferenciarse y dar lugar a tejidos de origen mesenquimal como: hueso, cartílago, músculo o grasa. A su vez, son diferentes de las células troncales hematopoyéticas (Friedenstein et al., 1970; Caplan, 1991). Las MSC procedentes de aspirados de médula ósea (BM-MSC) han sido las células más estudiadas para la ingeniería del tejido óseo (Caplan, 2007).

La médula ósea fue considerada, originariamente, como la principal fuente de células mesenquimales (Barba et al., 2013). Diversos estudios han demostrado la multipotencialidad de las BM-MSC, capaces de diferenciarse a células mesenquimales de diversos tejidos, tales como: hueso (Quarto et al., 2001; Kito et al., 2004; Funk et al., 2007; Jäger et al., 2009), cartílago (Johnstone et al., 1998), tejido adiposo (Pittenger et al., 1999), tendón (Young et al., 1998), músculo (Wakitani, Saito y Caplan, 1995) y estroma (Prockop, 1997). Además, durante la última década, se ha observado que las BM-MSC se pueden diferenciar también hacia distintos tipos celulares de linajes ectodérmicos, como neuronas (Woodbury et al., 2000) o células de tejidos de origen endodérmico, como hepatocitos (Lee et al., 2004; Aurich et al., 2007) y células pancreáticas (Moriscot et al., 2005). Por otra parte, se han podido aislar MSC en otros tejidos adultos como cerebro, músculo esquelético, dermis (Valcz et al., 2011; Yabana et al., 2009), periostio (Puglisi et al., 2011), líquido sinovial (Moroni y Fornasari,

2013) y sangre de cordón umbilical (De Coppi et al., 2007; Barba et al., 2012; Chao et al., 2012; Longo et al., 2012; Yang et al., 2012).

1.2. ESTADO ACTUAL

Las células mesenquimales adultas poseen notables ventajas respecto a las embrionarias. Si bien estas últimas son pluripotentes, las adultas no presentan riesgo inmunitario alguno, ya que se extraen del propio paciente y se reimplantan en él, sin riesgo de rechazo; además, tienen bajo riesgo tumorigénico, no plantean limitaciones éticas ni legales y se aíslan de un individuo adulto.

Las células mesenquimales autólogas aisladas de la médula ósea se han utilizado de forma satisfactoria para la regeneración de defectos críticos óseos. Actualmente, existen estudios que consiguen esta reparación a partir de células mesenquimales autólogas procedentes de tejido adiposo, esto es, células troncales derivadas del tejido adiposo o ASC. Lendeckel et al. (2004) demostraron cómo las ASC autólogas promovieron la regeneración de un defecto óseo craneal en un niño de 7 años. Más recientemente, Mesimäki et al. (2009) registraron el primer caso de colgajo ectópico microvascularizado desarrollado a partir de ASC y reimplantado, posteriormente, en un paciente al que se le había sometido a una hemimandibulectomía.

La fuente más accesible y con mayor cantidad de MSC adultas es el tejido adiposo (Gimble y Guilak, 2003). Se ha convertido en el tejido de elección para muchos autores, debido a su facilidad de obtención, abundante celularidad y menor morbilidad (Gronthos et al., 2001; Zuk et al., 2001; Scherberich et al., 2010; Han et al., 2014).

Ciertos estudios recientes, han investigado la influencia que algunos factores, como la edad y el índice de masa corporal (BMI), puedan ejercer sobre el número aislado y capacidad de diferenciación de las ASC obtenidas a partir de lipoaspirados. Van Harmelen et al. (2003) estudiaron mujeres sometidas a cirugías reductoras de mama. Revelaron que existe una relación directa entre el BMI y la edad, por un lado, y la cantidad total de ASC que se pueden aislar, por otro. Sin embargo, parece existir una relación inversa entre el BMI y la capacidad de diferenciación de las células.

Por otro lado, Padoin et al. (2008) concluyen que el abdomen y la cara interna del muslo parecen tener las concentraciones más altas de células obtenidas por lipoaspirado, lo que convertiría estas áreas en los mejores sitios donantes de células mesenquimales adultas.

La cantidad de fracción vásculo-estromal que se obtiene depende mucho de la especie animal; incluso, dentro de una misma especie, varía entre donantes, así como según la región donde se haga la liposucción. La cantidad de células ASC en la fracción vásculo-estromal de la grasa subcutánea (5000 CFU/g de tejido adiposo) es significativamente más alta que la cantidad de células que se pueden obtener de la médula ósea (entre 100-1000 CFU/ml).

El tejido adiposo se presenta como una fuente muy oportuna de MSC para la ingeniería tisular y la medicina regenerativa, según los datos expuestos hasta el momento (Gronthos et al., 2001; Zuk et al., 2001). Las ASC, por su alto poder de diferenciación (Zuk et al., 2002; De Ugarte et al., 2003; Rigotti et al., 2007; De Girolamo et al., 2007, 2008; Bunnell et al., 2008) y por su reducida inmunogenicidad (Le Blanc et al., 2003; Barry, 2003; Majumdar et al., 2003), pueden considerarse excelentes candidatas para las aplicaciones en medicina regenerativa. Además, las ASC poseen también la capacidad de diferenciarse hacia linajes no mesodérmicos; de esta forma, se pueden obtener células de origen ectodérmico (Kang et al., 2004; Kingham et al., 2007; Trottier et al., 2008) como células neuronales (Safford et al., 2002; Zuk et al., 2002; Ashjian et al., 2003; Fujimura et al., 2005), células epiteliales (Brzoska et al., 2005) y células endoteliales (Planat-Benard et al., 2004; Fraser et al., 2006), así como células de origen endodérmico como hepatocitos (Seo et al., 2005; Banas et al., 2007) y células pancreáticas (Timper et al., 2006). Sin embargo, a pesar de su aparente pluripotencialidad, las ASC carecen de la capacidad para diferenciarse en todos los tejidos embrionarios (Fortunel et al., 2003).

Las ASC se caracterizan por tener una morfología, un fenotipo y una capacidad de diferenciación *in vitro* similares a las de las BM-MSC, así como mayor capacidad de proliferación. Es posible obtenerlas más fácilmente a partir de muestras de tejido.

Básicamente, hay tres maneras de regenerar hueso usando ASC. Una implica la previa diferenciación *in vitro* en células progenitoras osteogénicas (Jurgens et al., 2011). Otra forma es aquella en la que las células se combinan con factores promotores de la osificación (Jeon et al., 2008). El tercer enfoque es aquel en que se utilizan *scaffolds* mineralizados con ASC sin ningún tipo de diferenciación previa (Hattori et al., 2006), donde la mineralización del *scaffold* es el factor decisivo para el éxito.

Este trabajo se centra en el primero de los enfoques.

La primera vez que se describió la existencia de células troncales adultas en el tejido adiposo subcutáneo fue en el año 2001 (Zuk et al., 2001). Se comunicó la existencia de un grupo de células homogéneas con aspecto fibroblástico, obtenidas a partir de la fracción

vásculo-estromal del tejido adiposo extraído por liposucción y que tenían la capacidad de diferenciarse a osteocitos, condrocitos y adipocitos (Sen et al., 2001).

En el año 2004, en la segunda reunión anual de la Sociedad Internacional de Tecnología Aplicada de la Grasa (Dominici et al., 2006), se definieron como ASC (*Adipose-derived Stem Cells*) aquellas células que cumplan los siguientes criterios:

- presentan morfología fusiforme;
- son aislables mediante digestión enzimática y adhesión a los cultivos;
- poseen capacidad de autorrenovación por largos períodos de tiempo;
- son multipotenciales (se diferencian a adipocitos, condrocitos y osteocitos);
- presentan un patrón molecular de superficie característico: CD29, CD44, CD71, CD90, y CD105/SH2 SH3; y un marcaje negativo para CD34, CD45, CD117; CD133 (Zuk et al., 2001; Zuk et al., 2002; K. Yoshimura et al., 2006).

Gimble, Katz y Bunnell (2007) definen qué cualidades debe tener una célula troncal para utilizarse con fines médicos:

1. Estar presentes en cantidades muy abundantes (de millones a billones de células).
2. Poder aislarse con procedimientos mínimamente invasivos.
3. Ser capaces de diferenciarse hacia múltiples linajes celulares de manera regulable y reproducible.
4. Permitir trasplantes en forma autóloga o alogénica.
5. Permitir la manipulación de acuerdo con las actuales Guías de Buenas Prácticas de Manufactura.

Las ASC cumplen con los criterios de Gimble et al. (2007). Considerando la incidencia de la obesidad en la población actual, esta es una fuente realmente abundante y accesible. El tejido adiposo puede ser obtenido mediante liposucción u otros métodos en grandes cantidades y con mínimo riesgo.

Zuk et al. (2001) usaron el término PLA (*processed lipoaspirate cells*, células provenientes de lipoaspirado) para describir una subpoblación de células progenitoras procedentes del lipoaspirado humano. El potencial multilínea de estas células lipoaspiradas lo confirmó este mismo grupo un año más tarde (Zuk et al., 2002).

Las ASC humanas autólogas (hASC) ya se han utilizado con éxito para mejorar la técnica de lipotransferencia (Matsumoto et al., 2006), para la cicatrización de lesiones isquémicas en pacientes que han sido sometidos a radioterapia (Rigotti et al., 2007), para el tratamiento de lipoatrofias faciales (Yoshimura et al., 2008b) o para el aumento de mamas (Yoshimura et al., 2008a). Recientemente, se ha demostrado que las ASC son capaces de

preservar la función cardíaca y aumentar la angiogénesis local si se administran tras infartos de miocardio en ratas atímicas (Cai et al., 2009)

Arrigoni et al. (2009) emplearon hASC en diferentes *scaffolds*, para comprobar la osteoinductividad, y observaron que estas células son sensibles al medioambiente tridimensional en que se alojan.

Tras el empleo de ASC osteoinducidas (esto es, dirigidas a diferenciarse hacia células óseas) en determinados *scaffolds*, estas mostraron un enorme potencial reparador de defectos craneales en conejos (Dudas et al., 2006; S. J. Yoon et al., 2007). En 2008, Tobita et al. demostraron que las ASC mezcladas con plasma rico en plaquetas provocaban la reparación de un ligamento similar al periodontal y del hueso alveolar en ratas.

De Girolamo et al. (2008) demostraron que las hASC proliferan más rápidamente y muestran una marcada capacidad clonogénica que decrece levemente a medida que aumenta el número de pases.

Los *scaffolds* son estructuras tridimensionales de gran importancia en la ingeniería ósea, ya que tienen como función dirigir la proliferación y diferenciación celular, así como dotar de soporte a las células.

Estas arquitecturas deben tener una serie de cualidades: ser biocompatibles (no tóxicas); ser porosas, con un grado de porosidad crítico, ya que deben proveer a las células de un ambiente óptimo para permitir la proliferación. Se considera que los poros deben tener un diámetro de al menos 100 micras para la difusión de los alimentos y oxígeno con el fin que las células sobrevivan (Rouwkema, Rivron y van Blitterswijk, 2008), aunque se considera que el tamaño del diámetro ideal está entre 200 y 350 micras (Murphy y O'Brien, 2010), para lograr una correcta vascularización y difusión de los nutrientes entre la matriz celular y el entorno. Además, deben poseer una estructura porosa interconectada, con una porosidad total superior al 80 % (Bellucci, Sola y Cannillo, 2011). Los estudios recientes revelan que son más eficaces aquellos *scaffolds* que combinan macro y microporosidad que aquellos que presentan solo macroporosidades (Woodard et al., 2007). Otra característica crucial es que deben ser biodegradables y con una velocidad de resorción más o menos semejante a la de formación del nuevo tejido y así crear el espacio necesario para el mismo (Bose, Roy y Bandyopadhyay, 2012); y deben provocar un mínimo grado de inflamación. «La superficie de los *scaffolds* debe ser la adecuada, tanto desde el punto de vista químico como topográfico, para permitir y facilitar la adhesión, diferenciación y proliferación celular. Las propiedades químicas de la superficie ayudarán a la adhesión, mientras que las propiedades topográficas tendrán relación con el proceso de osteoconducción o migración celular» (Sandonis Oleaga, 2015).

En cuanto a su estructura, los *scaffolds* pueden ser inyectables o sólidos prefabricados. Los inyectables, cuyo ejemplo más representativo son los hidrogeles, pueden ser introducidos en forma líquida en la lesión y llevan a cabo el proceso de entrecruzamiento (*cross-linking*) *in situ*; por lo tanto, la forma del defecto no es una limitación para este tipo de estructuras. Si bien es cierto que su implantación es poco invasiva, también puede resultar citotóxica. Un aspecto que limita el alcance de los *scaffolds* inyectables es que sus propiedades mecánicas son inferiores a las de los prefabricados, y por ello solo se aplican a ciertas estructuras maxilofaciales o de otras zonas que soportan poca carga (Nguyen y West, 2002).

Dentro de los sólidos prefabricados encontramos 2 grupos: Inorgánicos y orgánicos.

Dentro de los inorgánicos encontramos los metálicos, principalmente construidos con titanio (Asti et al., 2010), acero, o hidróxido de magnesio (Janning et al., 2010).

Otra variedad son los cerámicos, los más empleados hoy en día, (Lichte et al., 2011), con distintas composiciones a base de fosfato de calcio y fósforo, y con distintas presentaciones, bien en bloques o en formas granuladas. Las primeras presentan la ventaja de resistir mejor las cargas, así como menor capacidad de migración. Las formas granuladas presentan mayor superficie para la colonización celular y se incorporan más rápidamente a los tejidos del huésped que las formas en bloque, que se remodelan más lentamente (Leong, Cheah y Chua, 2003). El problema con los gránulos es su tendencia a migrar, por lo que deben ser retenidos en el sitio donde pretendan ser implantados mediante una barrera contenedora. Todos ellos supusieron un gran avance, por tener una composición semejante a la del hueso, así como por presentar osteoconductividad (LeGeros 2002). El fosfato de calcio, en forma de cerámicas como la hidroxiapatita o el fosfato tricálcico, se ha utilizado debido a su composición, ya que su estructura es muy semejante a la fase mineral del hueso natural, lo que se traduce en una excelente biocompatibilidad.

Por último, y también dentro de los *scaffolds* inorgánicos, cabe destacar los biocristales, que forman estructuras 3D con poros interconectados. Los vidrios de silicato bioactivos, que fueron descubiertos por Hench en 1969 (Hench, 1991; Hench, 2006), ofrecen notables ventajas en términos de bioactividad, puesto que son capaces de adherirse, por ambos lados, a los tejidos blandos y al hueso. Su principal desventaja es la fragilidad mecánica.

Un segundo grupo serían los orgánicos, principalmente, los polímeros biocompatibles y degradables. Entre los naturales, encontramos el colágeno tipo I, ácido hialurónico, heparin y quitosano (Cristino et al., 2005; Tuzlakoglu y Reis, 2007; Feng et al., 2003; Sagnella y Mai-Ngam, 2005). Muchos de los polímeros naturales, por estar presentes en el organismo humano, ya poseen propiedades que les permiten interactuar con el componente celular; de no

ser el caso, estos son generalmente fáciles de modificar con moléculas que se lo permitan. Entre los biomateriales sintéticos están el polietilenglicol y algunos polímeros biodegradables, como los poli (α - hidroxí ésteres). Estos últimos son un grupo de polímeros conformados por policaprolactona, ácido poliláctico, ácido poliglicólico y co-polímeros, muchos de ellos utilizados en la fabricación de suturas y otros materiales quirúrgicos (Hollinger y Battistone, 1986; Ishaug et al., 1994; Tuzlakoglu y Reis, 2007; Yuan, Mak y Li, 2001). A diferencia de los naturales, los polímeros sintéticos, en su mayoría, carecen de grupos funcionales activos que puedan interactuar con las células (Alvarez-Barreto y Sikavitsas, 2007; Ishaug et al., 1997). Producen, en su degradación mediante hidrólisis, pequeñas reacciones inmunológicas, de cuerpo extraño y acidificación del medio (Bose et al., 2012).

La combinación de cristales bioactivos con polímeros biodegradables mejora las características biológicas y mecánicas. Las propiedades mecánicas representan uno de los requisitos más importantes, ya que se necesita que el *scaffold* soporte las demandas mecánicas del lugar lesionado mientras se produce el recambio por hueso neoformado, lo que implica que la ratio de formación de este hueso y la degradación del *scaffold* debe ser la misma. Esto dependerá de las características del material, de la zona a regenerar y del paciente como tal (Whang et al., 1999).

2. HIPÓTESIS

Se plantean tres hipótesis:

1. ¿Es posible lograr regeneración ósea a partir de hASC diferenciadas a células osteogénicas, en combinación con *scaffolds* de suero humano y glutaraldehído, en defectos críticos mandibulares de ratas atímicas?
2. ¿Es posible la regeneración ósea de dichos defectos de manera espontánea?
3. ¿Es posible la regeneración ósea de dicho defecto mediante el empleo exclusivo del *scaffold*?

3. OBJETIVOS

Los objetivos son:

- Aislar y expandir hASC a partir de pequeños fragmentos de tejido adiposo humano.
- Caracterizar *in vitro* estas células.
- Fabricar el *scaffold* necesario para implantarlas.

- Diferenciar las hASC a células osteogénicas *in vitro* y comprobar este hecho.
- Ver el comportamiento *in vitro* del cultivo secundario.
- Regenerar defectos críticos mandibulares de ratas atímicas tratados con hASC diferenciadas y el *scaffold*, así como establecer la presencia de hueso humano en el defecto.
- Estudiar los efectos del tratamiento histológica, inmunohistoquímica y radiológicamente.
- Establecer el grado de osificación a los 45 y 90 días del tratamiento.
- Establecer si se trata de defectos críticos.
- Determinar si hay regeneración ósea con el empleo exclusivo de *scaffolds*.

4. MATERIAL Y MÉTODO

4.1. CULTIVO DE LAS HASC

Se obtuvo 1 cm² de tejido adiposo subcutáneo recogido del muslo de pacientes que se sometieron a una reconstrucción microquirúrgica debido a un carcinoma epidermoide de la cavidad oral. La zona dadora fue la región anterolateral del muslo y no causó morbilidad adicional. Se obtuvo un consentimiento informado, previo a la cirugía, y el procedimiento fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital Universitario Central de Asturias (08/04/2011. Código: 282011).

Las muestras de tejido adiposo fueron procesadas para obtener hASC de la siguiente manera: la muestra se lavó tres veces con PBS (*phosphate buffered saline*),¹ se cortó y se colocó en un tubo de ensayo. Después de agregar 0,1 ml de colagenasa I ² en un medio de cultivo DMEM,³ la suspensión fue agitada y digerida durante una hora a 37 °C. La digestión se detuvo mediante la adición de suero fetal bovino⁴ (SFB) al medio de cultivo. Después se filtró mediante filtro celular de 0,40 µm⁵ y se centrifugó a 500 G durante 10 minutos. Las células fueron sembradas en matrices de poliestireno de 25 cm² ⁶en un medio de cultivo HASC, consistente en una dosis baja de glucosa, DMEM, 10 % SFB, 100 U/ml de penicilina⁷ y 100

¹ PAA Laboratories GmbH (Cölbe, Alemania).

² Sigma-Aldrich (Madrid, España).

³ Gibco, Invitrogen (Paisley, Reino Unido).

⁴ Gibco, Invitrogen.

⁵ BD Bioscience (Madrid, España).

⁶ Cultek (Madrid, España).

⁷ Gibco, Invitrogen.

$\mu\text{g/ml}$ de estreptomicina⁸. Las células fueron cultivadas en una atmósfera controlada (37 °C, 5 CO₂) durante 48 horas. Pasado dicho tiempo, el medio fue reemplazado y las células no adheridas se retiraron. Posteriormente, el medio se repuso cada 2 o 3 días y, entre el 7 y 8 día, cuando el cultivo fue confluyente, las células se digirieron con tripsina (0,25 % w/v)⁹ y se sembraron en 2 frascos de 75 cm².¹⁰ Se repite el mismo procedimiento siendo empleadas células del 2º y 3º pase.

4.2. CARACTERIZACIÓN DE LAS HASC MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO

Los marcadores empleados fueron los propuestos por *The Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee of the International Society for Cellular Therapy* (Dominici et al., 2006). Los anticuerpos fueron contra CD34-PerCpCy5,5,¹¹ CD73-Pe,¹² CD90-FITC,¹³ CD105-APC¹⁴ y CD45-PeCy7.¹⁵ Las células fueron incubadas con agente bloqueante FcR¹⁶ durante 20 minutos a 4 °C para evitar enlaces al anticuerpo inespecífico. A continuación, las células fueron teñidas con los anticuerpos y su isótopo de control durante 30 minutos a 4 °C.

Todos los controles de fluorescencia, menos uno, fueron teñidos en paralelo usando el panel de anticuerpos con omisión secuencial de un anticuerpo. Después de lavarlas, las células fueron resuspendidas en 0,5 ml 1x SFB y tamizadas usando un filtro celular de nylon de 35 μm .¹⁷ Las muestras fueron analizadas usando un Becton Dickinson FACSAria con el programa FACSDiva 6.1.2.¹⁸

4.3. CONSTRUCCIÓN DEL SCAFFOLD

El *scaffold* se elaboró según la patente W02008119855 (Meana et al., 2008). Brevemente, se obtuvieron de un banco de sangre 10 ml de sangre venosa humana y se mantuvieron a 37 °C durante 30 minutos. A continuación, se centrifugaron durante 15

⁸ Gibco, Invitrogen.

⁹ Gibco, Invitrogen.

¹⁰ Cultek (Madrid, España).

¹¹ BD Bioscience.

¹² BD Bioscience.

¹³ eBioscience (Barcelona, España).

¹⁴ eBioscience.

¹⁵ eBioscience.

¹⁶ eBioscience.

¹⁷ Becton Dickinson, (Madrid, España).

¹⁸ Becton Dickinson.

minutos a 2000 G y el suero resultante (5 ml) fue reticulado con 0,25 ml de glutaraldehído al 25 % ¹⁹ y trasladado a una jeringa desechable de 5 ml. Después de mantener la solución de suero-glutaraldehído a temperatura ambiente durante 30 minutos hasta la solidificación, fue congelada y mantenida a -80 °C durante toda la noche. A continuación, la jeringa se abrió y la solución se liofilizó durante 48 horas y se rehidrató en una serie de etanol gradual (100-90-80) por inmersión durante una hora en cada dilución (Figura 1).

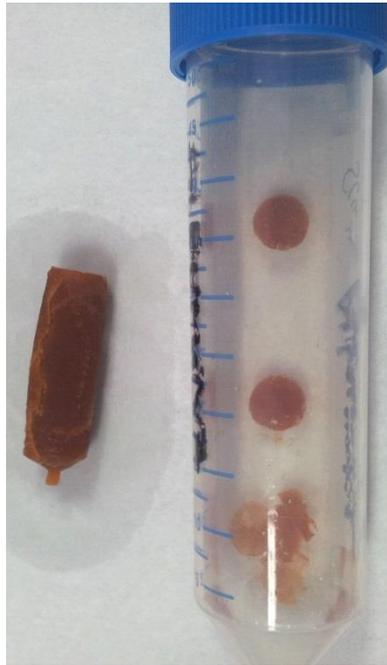


Figura 1: Aspecto macroscópico del *scaffold*

La estructura en forma de tubo obtenida se cortó en láminas de 4 mm de diámetro y de 1-2 mm de grosor, y esterilizadas en etanol (70) durante 8 horas. Finalmente, los *scaffolds* fueron neutralizados en DMEM. Antes de la siembra celular, se eliminó el exceso de fluido y los *scaffolds* se colocaron en una placa de cultivo de 24 pocillos²⁰ a razón de un *scaffold* por pocillo.

4.4. CULTIVO SECUNDARIO

Una vez los cultivos fueron confluentes, se sometieron a digestión enzimática y las células se contaron con un hemocitómetro Neubauer. Las células liberadas se resuspendieron en DMEM con 10 % de SFB. A continuación, se sembraron 1×10^6 células en los pocillos. Se

¹⁹ Merck (Darmstadt, Alemania).

²⁰ Nunc (Darmstadt, Alemania).

mantuvieron bajo agitación durante 4 horas para permitir a las células adherirse. El medio de cultivo se renovó dos veces por semana. Las células se conservaron a 37 °C durante 7 días en un ambiente humidificado al 5 % de CO₂ antes del trasplante.

4.5. DIFERENCIACIÓN DE HASC EN CÉLULAS OSTEOGÉNICAS (AIOS)

La diferenciación en AiOs fue alcanzada mediante el uso del medio NH Osteodiff²¹ durante un período de 15 días. El medio se cambió cada 2-3 días.

4.6. ANÁLISIS ESTRUCTURAL DE LOS CULTIVOS SECUNDARIOS MEDIANTE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO

Las características estructurales, tanto de los *scaffolds* solos como con AiOs, se observaron por microscopía electrónica de barrido (MEB). Los *scaffolds* se fijaron en glutaraldehído al 2 % y tamponados con fosfato 0,1 M²² durante 12 horas. Las muestras fijadas se deshidrataron en una serie gradual de acetona (30-50-70-90-100.Merck) y, posteriormente, secadas a punto crítico utilizando CO₂.²³ Estas muestras fueron recubiertas mediante pulverización de oro (Bal-tec SCD 004) y luego analizadas con MEB (JEOL LSM 6100, Tokio, Japón).

4.7. EVALUACIÓN IN VITRO DE LA CAPACIDAD OSTEOGÉNICA

A fin de detectar la capacidad osteogénica temprana, se procedió a detectar la producción de fosfatasa alcalina²⁴ por parte de las células y se realizó un microanálisis de fósforo y calcio (al principio del cultivo y a las 2 semanas). Realizamos estos procedimientos en *scaffolds* sin células y *scaffolds* con AiOs. Para detectar la producción de calcio y fósforo, se usó el SSD X-MAX 50.²⁵ Los resultados fueron analizados con el programa INCA ENERGY 350.

²¹ Miltenyi Biotec (Madrid, España).

²² Panreac (Barcelona, España).

²³ Bal-tec CPD 030 critical point dryer (Balzers, Alemania).

²⁴ Sigma Fast BCIP/Nbt (Barcelona, España).

²⁵ Oxford Instruments (High Wycombe, Reino Unido).

4.8. EVALUACIÓN DEL DEPÓSITO MINERAL IN VITRO

Tanto el *scaffold* solo como el *scaffold* con AiOs fueron teñidos siguiendo el método von Kossa para evaluar el depósito mineral en el cultivo secundario previo al trasplante en animales.

4.9. PROCEDIMIENTO CON UN MODELO ANIMAL

Para el manejo de los animales, se siguió las pautas de cuidado de los animales establecidas por la Facultad de Medicina de la Universidad de Oviedo (España), que siguen los procedimientos ICLAS y a directiva 86/609/EEC. El procedimiento fue aprobado por el Comité de Ética de Experimentación Animal de Asturias (27/12/12. Código: 18-INV-2012).

Como modelos animales, se emplearon ratas machos de entre 11 y 12 semanas *rnu/rnu* (Crl: NIH-Foxn1), de peso entre 250 y 300 gramos cada una.²⁶ Estas se encontraban en una habitación de atmósfera controlada, con una temperatura de 23± 1 °C y una humedad de 55±5 %. Asimismo, eran sometidas a ciclos de luz y oscuridad de 12 horas, realizándose el encendido de luces a las 8:00 y apagándose a las 20:00.

Dentro de la habitación en la que se encontraban, las ratas estaban en jaulas con virutas de madera y papel, a modo de lecho, y tenían acceso continuo a agua estéril, así como al aprovisionamiento diario de comida por parte del personal del Bioterio de la Universidad de Oviedo el cual, mediante un programa de seguimiento de la salud de acuerdo con la Sociedad Española para las Ciencias del Animal del Laboratorio (SECAL) y establecido por la Facultad de Medicina (Universidad de Oviedo, España), se encargó de la monitorización de la salud de los animales durante todo el procedimiento.

La cirugía llevada a cabo consistió en la realización de dos defectos críticos mandibulares, uno en cada ángulo mandibular del animal, y el posterior relleno de dichos defectos con *scaffold* y hASC, o solo con el *scaffold* a modo de control. Se seleccionaron determinados animales donde no se colocó ningún tratamiento con el fin de comprobar si se producía la regeneración espontánea del defecto.

El procedimiento se realizó bajo una campana de flujo laminar y con sedación profunda de los animales mediante una única dosis de enrofloxacino 10g/100 ml ²⁷ (30mg/kg) aplicada por vía intraperitoneal, así como buprenorfina²⁸ (0.05mg/kg), meloxicam (2

²⁶ Charles Rivers (Barcelona, España).

²⁷ Dr. Esteve (Barcelona, España).

²⁸ Boehringer Ingelheim (Barcelona, España).

mg/kg).²⁹ Tras la anestesia, se usó una fresa de trefina de 4 mm ³⁰ para realizar un defecto crítico de 4 mm desde el lado externo al interno de cada ángulo mandibular (Figura 2).

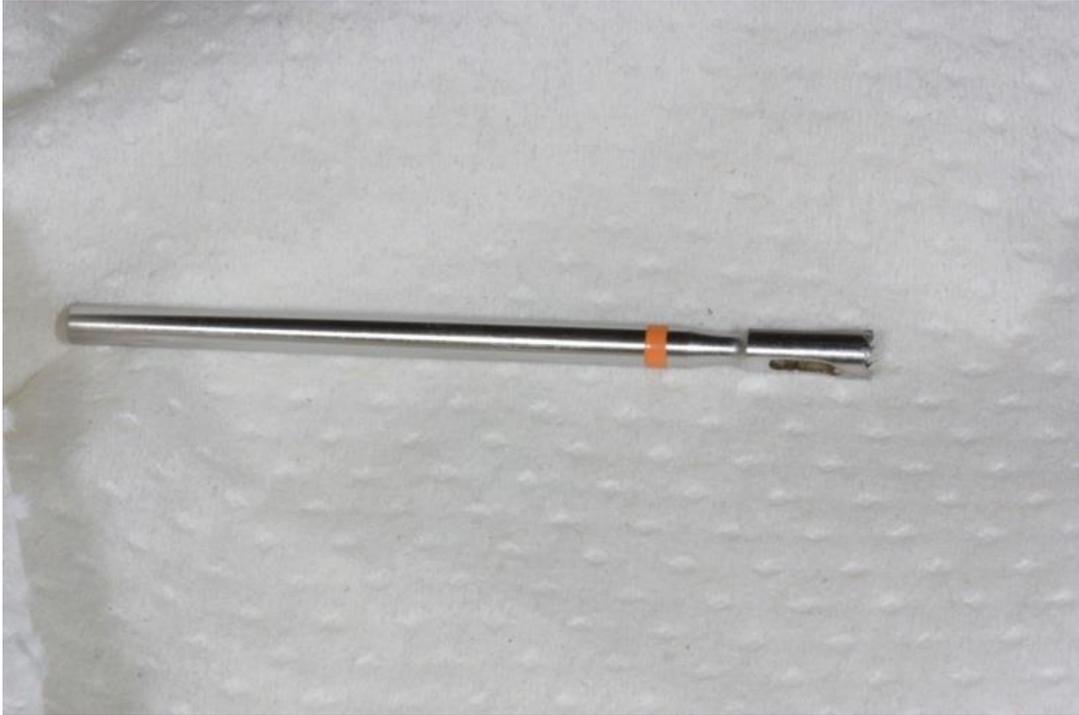


Figura 2: Trefina para la realización de los defectos

En el ángulo derecho de todos los animales, se implantaron células con *scaffold*. En el lado izquierdo, se usó *scaffold* carente de células en la mitad de los animales. En la otra mitad, se dejó el defecto sin tratar (Figura 3).

²⁹ Boehringer.

³⁰ Surgimedica (Asturias, España).

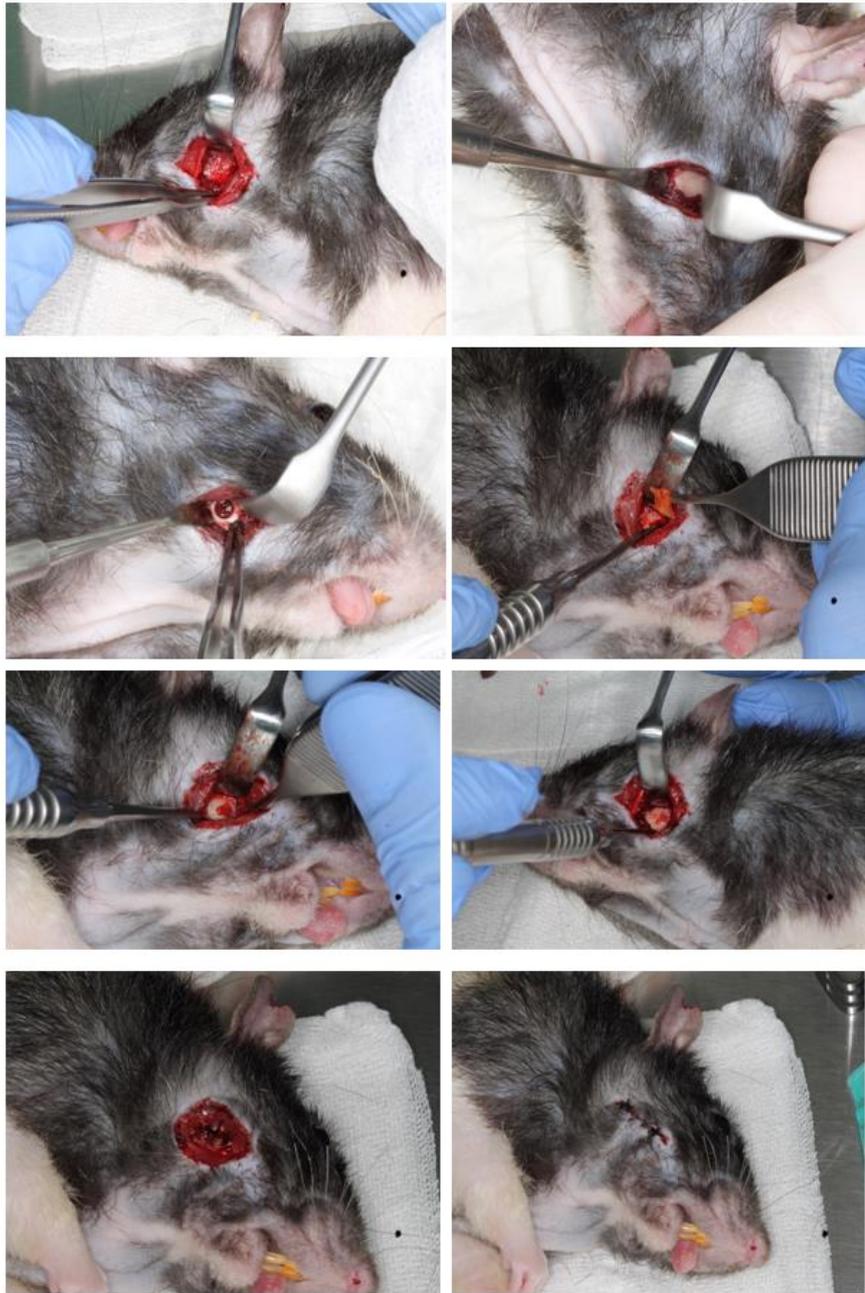


Figura 3: Creación de los defectos y relleno con el tratamiento propuesto

En ninguno de los casos se usó membranas para cubrir el defecto. La sutura empleada para el cierre de los tejidos blandos fue seda 3/0. Durante 3 días después de la cirugía, se administró meloxicam (2 mg/kg) a modo de analgésico, siendo controlados por el personal del bioterio diariamente durante la primera semana tras la cirugía y cada dos días en adelante hasta la finalización del procedimiento. Cada grupo fue subdividido en dos periodos de

tiempo: 45 y 90 días. El número de sujetos fue de 10. Es decir, fueron tratados un total de 20 ángulos mandibulares: 10 ángulos por grupo y 5 por cada período.

4.10. VALORACIÓN MACROSCÓPICA DE LA REGENERACIÓN ÓSEA

Una vez pasado el tiempo establecido, los animales fueron sacrificados usando monóxido de carbono y sus mandíbulas fueron extirpadas y procesadas para estudiar la regeneración ósea. Para este propósito, se usó una fresa trefina de 5 mm.³¹ Se realizó un primer análisis visual para valorar la regeneración ósea macroscópicamente.

4.11. EVALUCIÓN HISTOLÓGICA DE LAS MUESTRAS

Las muestras fueron deshidratadas en una serie gradual de etanol y fijadas durante la noche en PFA al 4 % en 0,1 M PBS a 4 °C, embebidas en parafina, y se cortaron secciones de 7 a 10 µm de espesor con un micrótopo (Microm, modelo HM310). Se utilizaron tinciones de hematoxilina-eosina y coloración de Tricrómico de Masson modificado por Goldner³² de la manera habitual. Algunas muestras fueron incrustadas en metil-metacrilato³³ y, después, se obtuvieron secciones de 5 µm de espesor mediante un micrótopo Polycut S.³⁴ La valoración de la existencia de mineralización fue realizada, posteriormente, mediante el método Von Kossa.

4.12. ANÁLISIS INMUNOHISTOQUÍMICO

Las secciones fueron montadas sobre portas de vidrio, se añadió PBS y la peroxidasa endógena fue bloqueada a los 30 minutos con H₂O₂ al 1 %. Las posibles tinciones de fondo se bloquearon incubando secciones durante al menos 30 minutos en 5 % BSA³⁵ en PBS. Las secciones fueron incubadas con anticuerpos monoclonales anti-vimentina humana³⁶ (1:5000) o con anti-STRO-1³⁷ (1:1000) durante toda la noche a 4 °C en cámara humidificada. Se empleó el kit de detección EnVision REAL.³⁸

³¹ Surgimedica.

³² Merck.

³³ Sigma-Aldrich.

³⁴ Reichert-Jung (Depew, EE. UU.).

³⁵ Merck.

³⁶ Novocastra, (Barcelona, España).

³⁷ Abcam, (Cambridge, Reino Unido).

³⁸ Dako (Barcelona, España).

Tanto los resultados histológicos como inmunohistoquímicos fueron documentados con un microscopio Olympus BX-41 acoplado a una cámara digital Olympus DP71, y los resultados fueron analizados usando el software de imagen del equipo.

4.13. CUANTIFICACIÓN DEL HUESO NEOFORMADO MEDIANTE μ CT Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para cuantificar la mineralización, todas las muestras fueron escaneadas con microtomografía de alta resolución (μ CT).³⁹ El pequeño dispositivo de soporte del μ CT fue usado para colocar el espécimen con su eje mayor perpendicular al suelo del dispositivo de soporte y de la fuente de rayos X.

Las imágenes se obtuvieron a 50 kV y 800 μ A. Todos los especímenes fueron escaneados usando un filtro de 0,25 mm y una resolución de 12 pixels. Para cada espécimen, se obtuvieron series de 613 proyecciones con una etapa de rotación de 0.3°, a un promedio de dos marcos para un total de 180° de rotación.

El tiempo de escaneado para cada muestra fue de aproximadamente 1 hora 30 minutos, con un tiempo de exposición de 4200 ms. La corrección de campo plano fue realizada al comienzo de cada escáner. Las imágenes obtenidas fueron reconstruidas usando el software Nrecon.⁴⁰

La corrección de valores del coeficiente de atenuación, endurecimiento del haz, suavización y reducción de ruido fueron las mismas para todas las muestras. Para el análisis de la densidad mineral ósea (BMD) se usó el software provisto por el fabricante (CTAn). La región de interés (ROI) fue ajustada manualmente para cada muestra y se eligieron 400 porciones. Los niveles de umbral de la escala de grises globales para estas áreas fueron de 120. Los parámetros fueron medidos de acuerdo con la nomenclatura histomorfométrica ASBMR (Parfitt et al., 1987).

Para demostrar las diferencias entre grupos, se realizó un análisis estadístico que consistió, primeramente, en un estudio descriptivo de los datos de cada grupo. Posteriormente, los datos fueron contrastados mediante el test Shapiro-Wilk, para probar la hipótesis de normalidad, y el test de Levene, para comprobar el supuesto de homocedasticidad. Finalmente, fue realizado un test de ANOVA. Para el análisis de los datos se empleó el programa SPSS.⁴¹ La significación estadística fue establecida en $p < 0,05$.

³⁹ SkyScan 1174, SkyScan (Kontich, Bélgica).

⁴⁰ SkyScan.

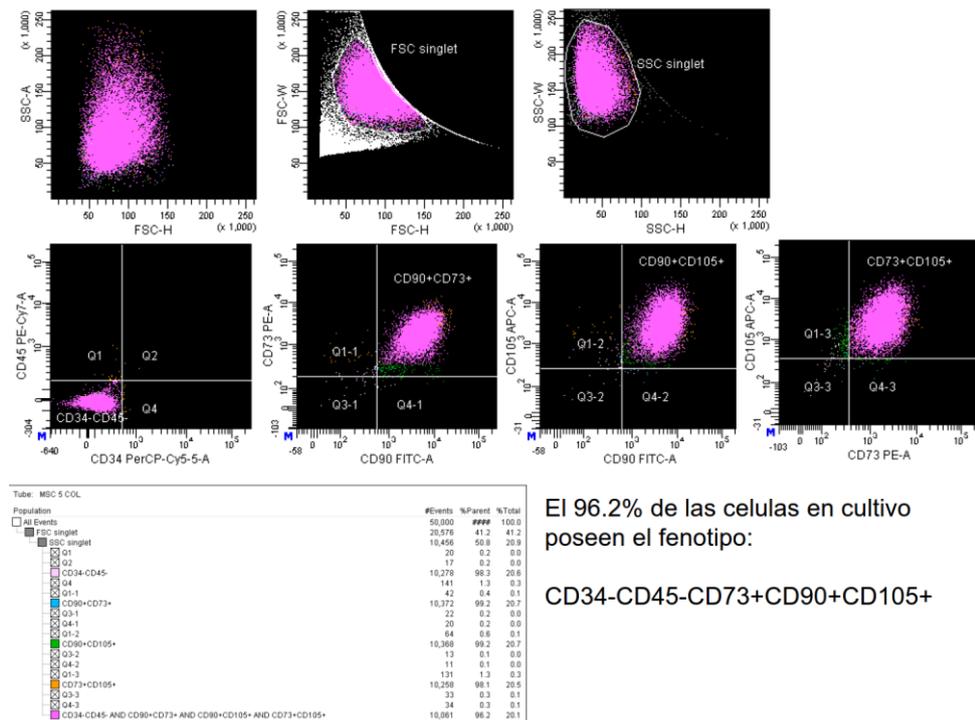
⁴¹ SPSS Inc. (Chicago, EE. UU.).

5. RESULTADOS

5.1. RESULTADOS IN VITRO

5.1.1. Caracterización molecular por citometría de flujo

La caracterización de las ASC mediante citometría de flujo permitió establecer el siguiente patrón molecular: positivas para los marcadores CD73, CD90, CD105 y negativas para los marcadores hematopoyéticos CD34 y CD45 (Figura 4).



El 96.2% de las células en cultivo poseen el fenotipo:

CD34-CD45-CD73+CD90+CD105+

Figura 4: Resultados citometría de flujo

Asimismo, fue posible su expansión en varios pases y observamos su morfología similar a los fibroblastos mediante microscopio óptico invertido (Figura 5). Todo ello corresponde con el perfil de ASC.

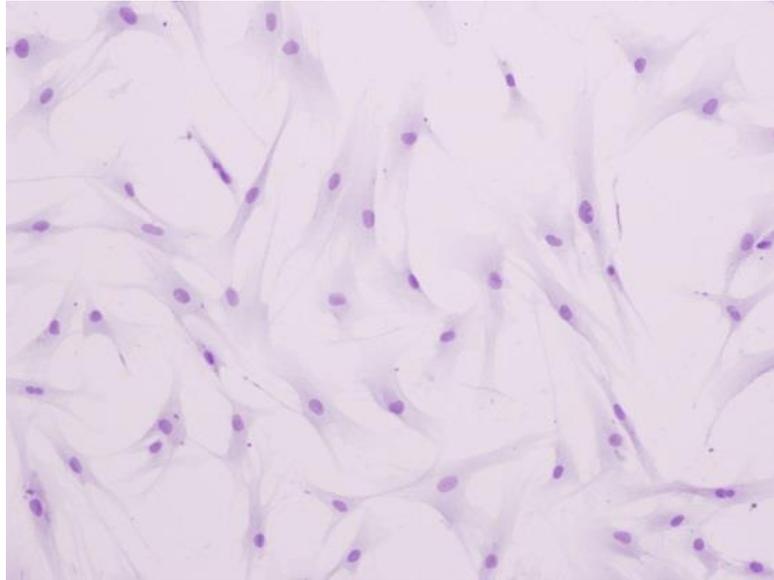


Figura 5: Aspecto de las células en cultivo

5.1.2. Detección temprana de osteogénesis

La fosfatasa alcalina se detectó en los cultivos secundarios de *scaffold* junto con AiOs después de 2 semanas de diferenciación. Por otro lado, los *scaffolds* solos o en combinación con ASC sin diferenciar, no se detectó la presencia de fosfatasa alcalina (Figura 6).

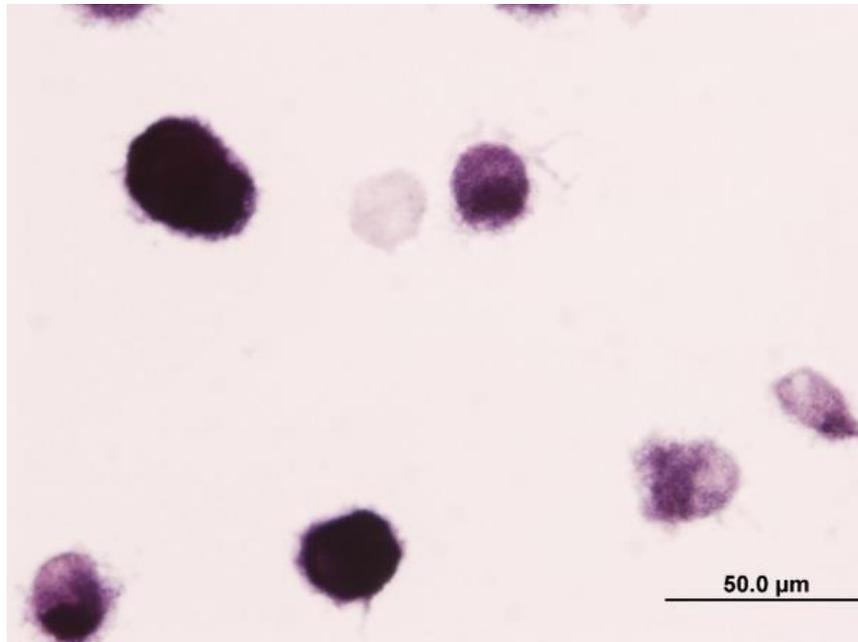
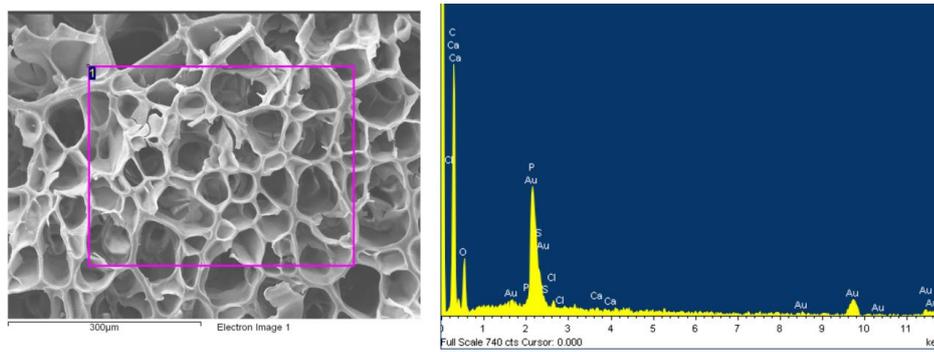


Figura 6: Frotis de células diferenciadas. Positivas para fosfatasa alcalina

En todos los cultivos, los valores de fósforo y calcio fueron 0,00 KeV (Figura 7).

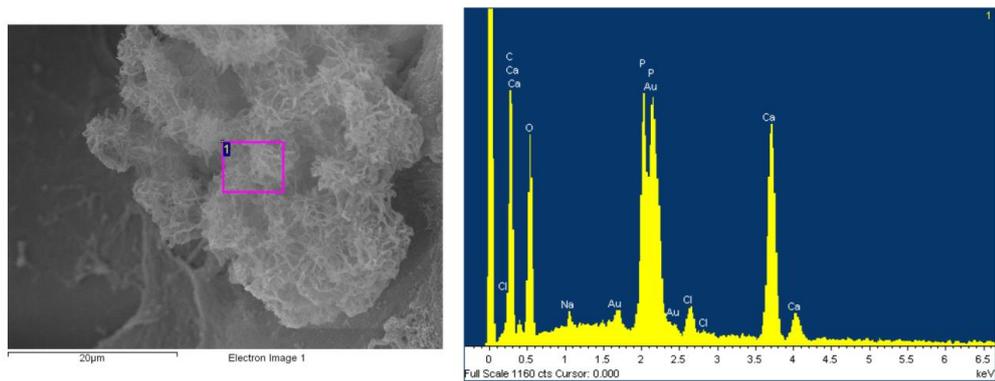


Processing option : All elements analysed (Normalised)

Spectrum	In stats.	C	O	P	S	Cl	Ca	Total
1	Yes	70.10	27.96	0.00	1.34	0.38	0.00	100.00
Mean		70.10	27.96	0.17	1.34	0.38	0.05	100.00
Std. deviation		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
Max.		70.10	27.96	0.17	1.34	0.38	0.05	
Min.		70.10	27.96	0.17	1.34	0.38	0.05	

Figura 7: Valores para calcio y fósforo previos a la diferenciación.

Después de 2 semanas de diferenciación, los cultivos con AiOs duplicaban la cantidad de ambos minerales, mientras que en los *scaffolds* solos o en combinación con ASC, se mantenían con 0,00 KeV (Figura 8).



Processing option : All elements analysed (Normalised)

Spectrum	In stats.	C	O	Na	P	Cl	Ca
1	Yes	57.97	37.20	0.30	1.92	0.28	2.33
Mean		57.97	37.20	0.30	1.92	0.28	2.33
Std. deviation		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Max.		57.97	37.20	0.30	1.92	0.28	2.33
Min.		57.97	37.20	0.30	1.92	0.28	2.33

All results in atomic%

Figura 8: Resultados tras diferenciación. Valores calcio y fósforo

5.1.3. Tinción Von Kossa de los cultivos secundarios

La tinción con Von Kossa de los *scaffolds*, solos o en combinación con ASC sin diferenciar, fue negativa. Solo expresó mineralización la combinación de los *scaffolds* con AiOs (Figura 9).

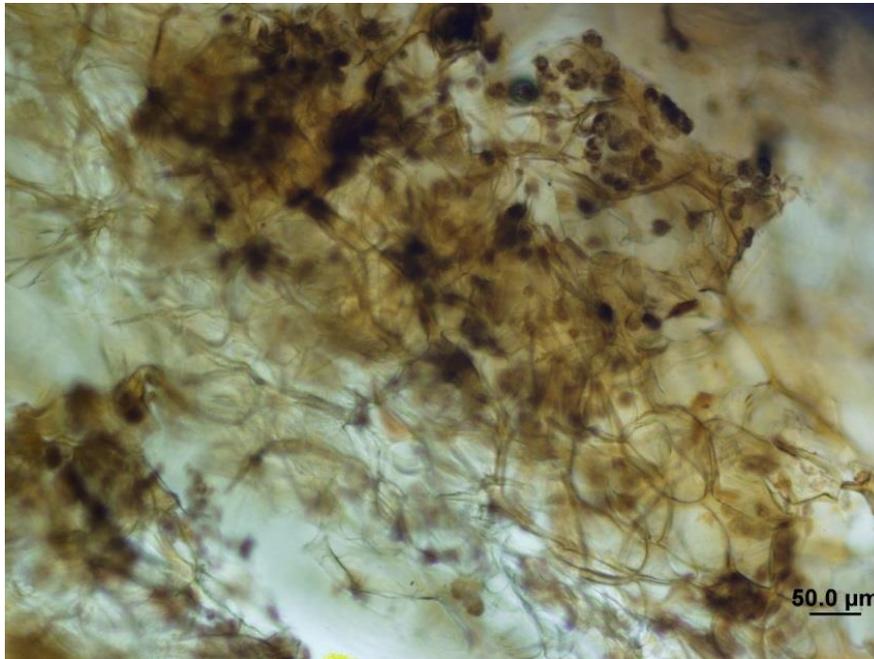


Figura 9: Von Kossa de AiOs en el *scaffold*

5.1.4. Microestructura del *scaffold* y morfología de las células por análisis MEB

Macrocópicamente, el *scaffold* actúa como una esponja en contacto con fluidos, pero adquiere rigidez en un ambiente libre de fluidos, lo cual facilita su manejo y control al llevarlo al área receptora del injerto.

Los *scaffolds* demostraron un aspecto ultraestructural similar al observado en las trabéculas óseas. La disposición trabeculada y la interconectividad de los poros proporciona una excelente superficie para que las células se adhieran y proliferen. El diámetro de los poros osciló entre 50 y 150 μm (Figura 10).

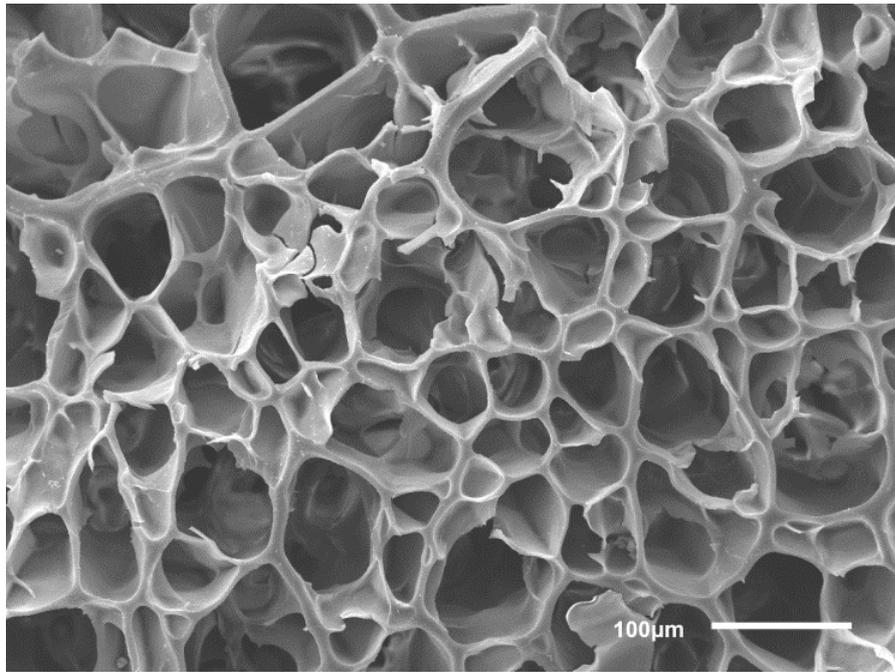


Figura 10: MEB del *scaffold* sin células

El estudio MEB de las células implantadas en el *scaffold* durante 7 días reveló que las AiOs se adhieren al *scaffold* y proliferan a través de sus poros (Figura 11).

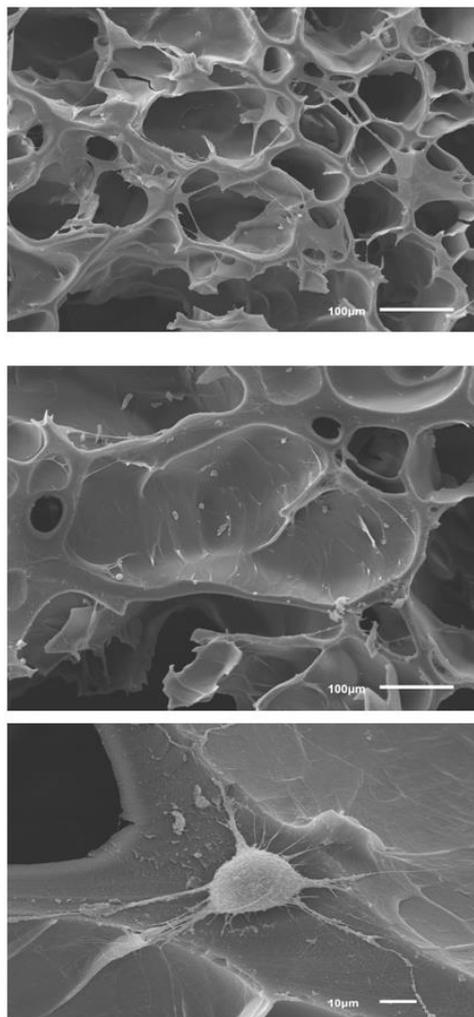


Figura 11: Adhesión y proliferación de las AiOs en el *scaffold*. MEB

5.2. RESULTADOS IN VIVO

5.2.1. EVALUACIÓN MACROSCÓPICA DE LOS RESULTADOS

Macroscópicamente, el grupo de *scaffold* y AiOs, con el tratamiento de 90 días, presentaba una regeneración completa, con aspecto similar al hueso circundante. A los 45 días, la regeneración no era completa aún. En el caso de emplear solo *scaffold*, se observó una fragilidad del tejido presente, además de no ser completa la neoformación ósea. En aquellos defectos en los que no se llevó a cabo un tratamiento, no se observó la presencia de ningún tipo de tejido (Figura 12).

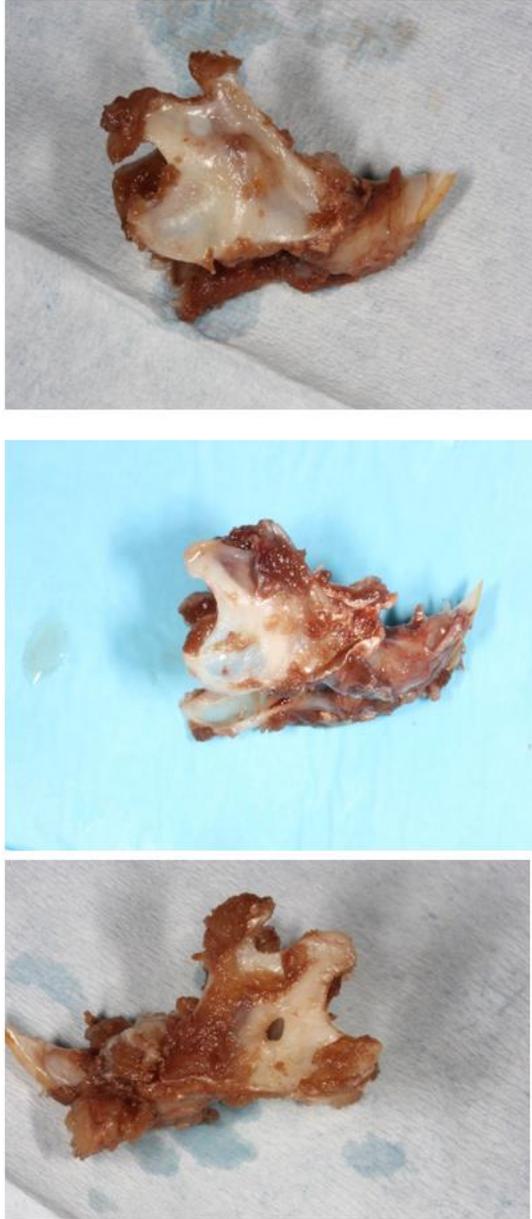


Figura 12: De arriba abajo: 45 días; 90 días; sin tratamiento

5.2.2. Evaluación histológica de las muestras

45 días y AiOs-scaffolds: Observamos una organización tisular similar al hueso en reparación, con una disposición central de células maduras y hueso mineralizado, y la disposición periférica de tejido osteoide. Se podían observar algunas áreas de osteonas en formación (figura hematoxilina y Masson) (Figura 13).

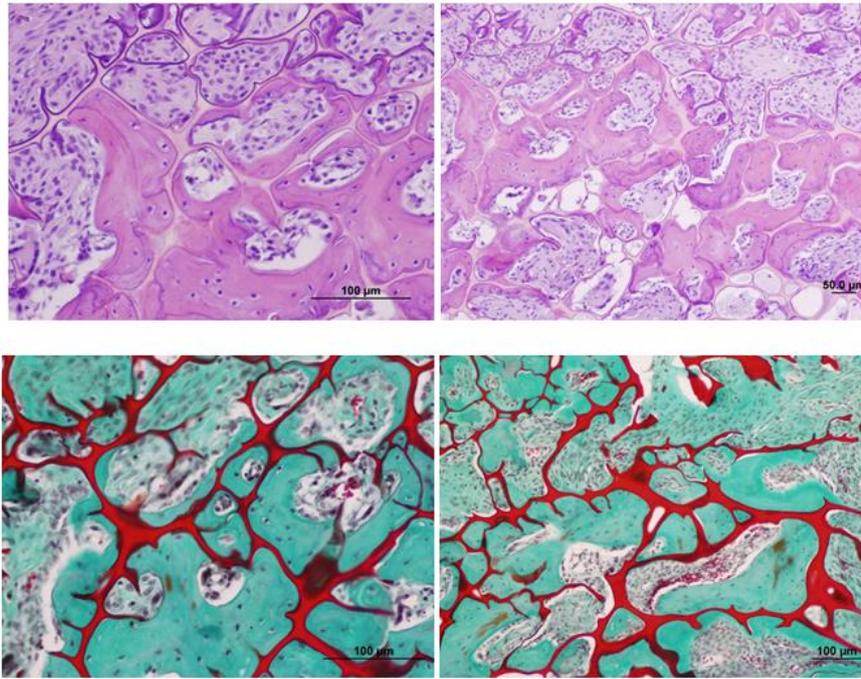


Figura 13: 45 días. Hematoxilina-Eosina (arriba). Tricrómico (abajo)

90 días y *AiOs-scaffolds*: No observamos células inmaduras. Todo el defecto se había regenerado y la estructura observada se asemeja al hueso cortical maduro. Las células se distribuían en torno a unidades similares a osteonas, y se comprobó la existencia de mineralización en todos los defectos. Tras 90 días, permanece una pequeña cantidad de *scaffold* (Figura 14).

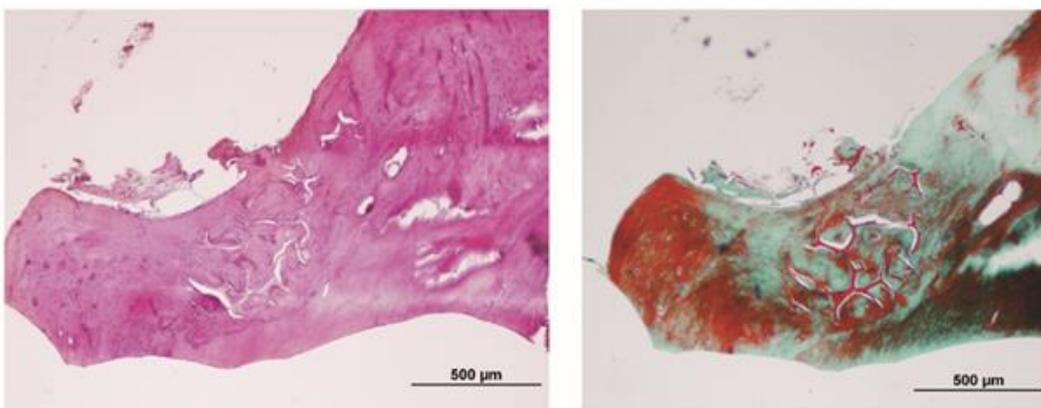


Figura 14: 90 días. Regeneración completa y osificación

Solo scaffold: No encontramos células en el núcleo del defecto. El *scaffold* sin componente celular presentó dificultad para integrarse en el hueso circundante al defecto. Se observó una pérdida de gran cantidad del mismo. Solo quedaban restos suyos en la zona periférica del defecto (Figura 15).

Observamos revascularización del *scaffold* en todos los tratamientos y en todos los períodos.

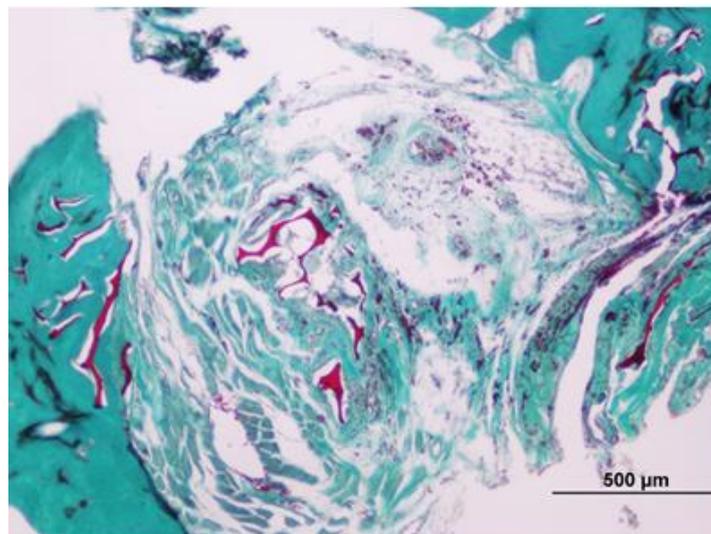
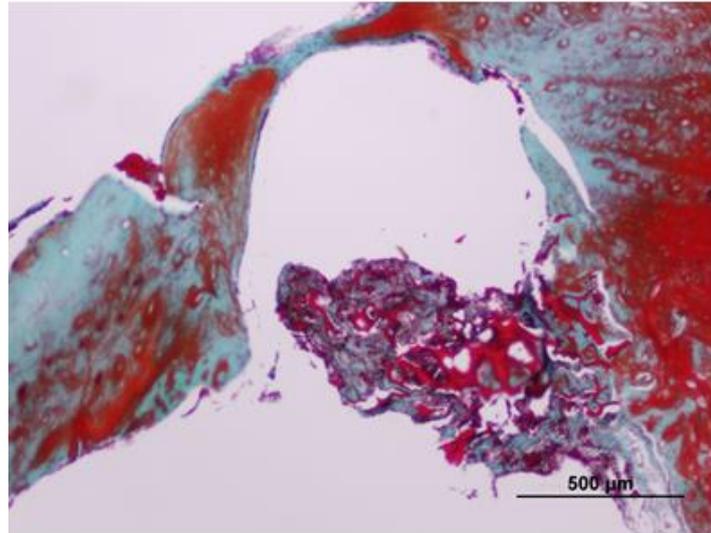


Figura 15: Solo *scaffolds*

Sin tratamiento: No detectamos actividad en el defecto.

5.2.3. Valoración de la existencia de mineralización en el defecto

La tinción de Von Kossa reveló cierto grado de mineralización cuando se emplean *AiOs-scaffolds* durante 45 días, pero los mejores resultados se alcanzan a los 90 días, ya que observamos una mineralización completa del hueso (Figura 16).

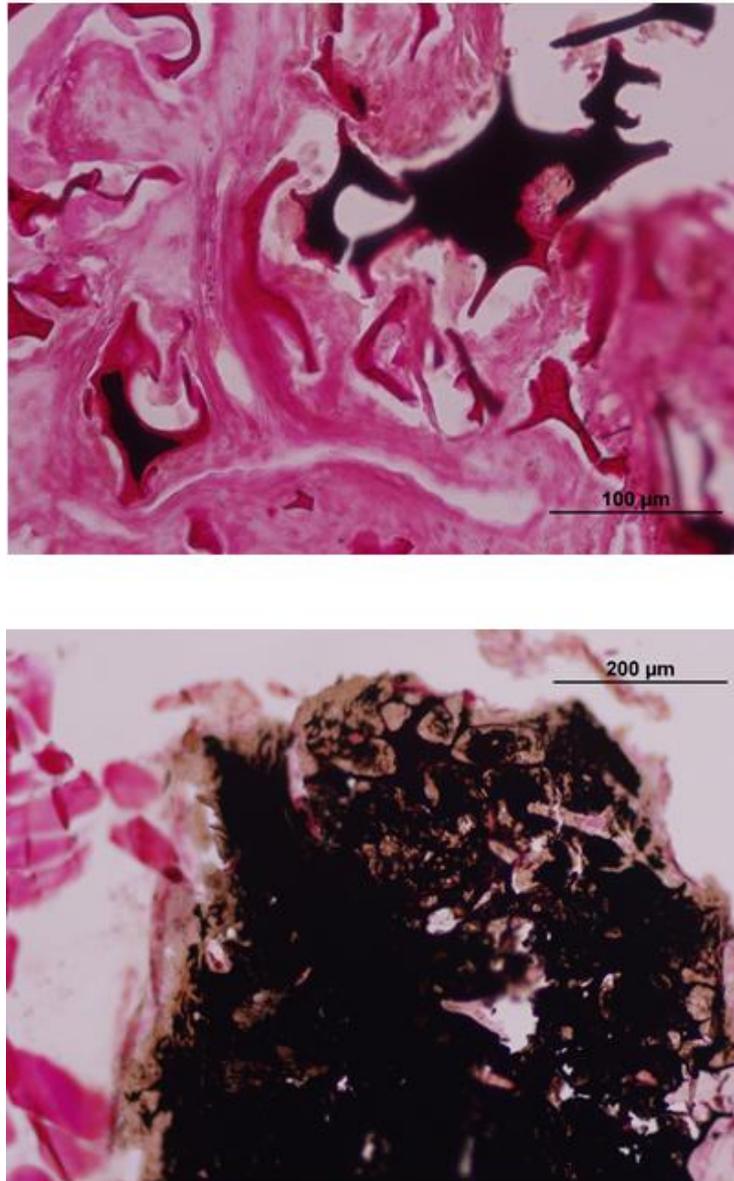


Figura 16: Von Kossa

5.2.4. Análisis inmunohistoquímico de las muestras

Detectamos vimentina en todas las muestras y no en el hueso huésped circundante, de acuerdo con la localización de las células que utilizamos. Este marcador, junto con el análisis histológico, sugiere que la mayor parte de células que aparecen en el núcleo del *scaffold* son células trasplantadas, por lo menos en las etapas tempranas (45 días), donde la positividad es más evidente (Figura 17).

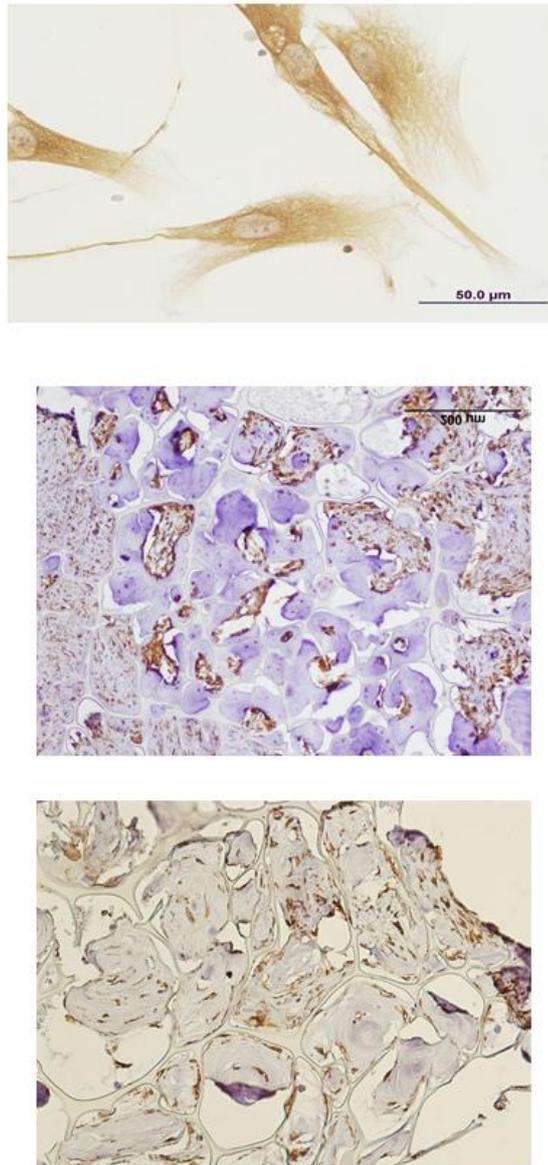


Figura 17: Vimentina positiva en células en cultivo e *in vivo*

En cuanto al STRO-1, solo encontramos positividad a los 45 días (Figura 18).

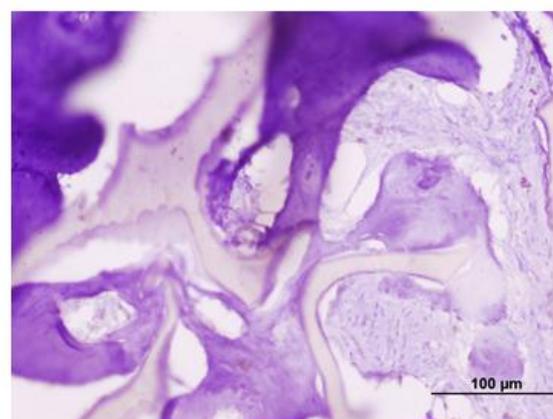
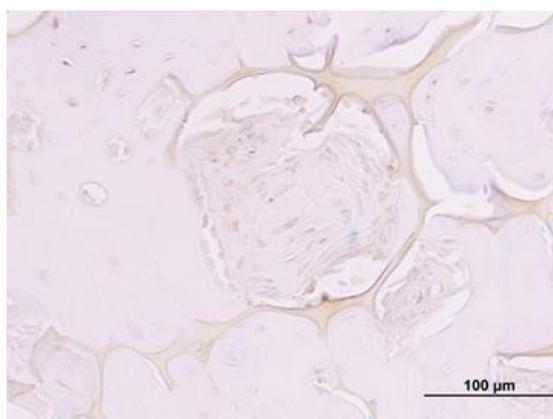
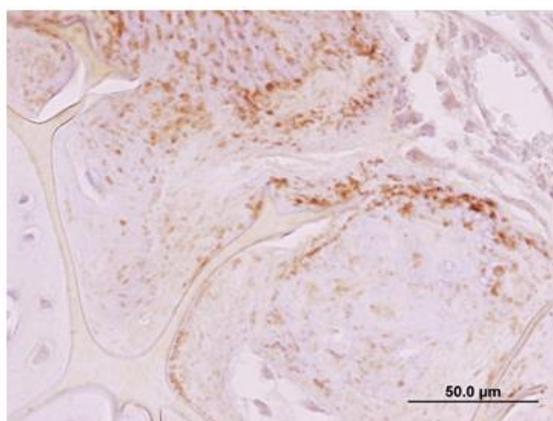


Figura 18: Stro-1 positivo solo a los 45 días y con células

5.2.5. Análisis de la imagen en μ CT

De acuerdo con los resultados clínicos e histológicos, la regeneración ósea completa se alcanzó con el tratamiento *AiOs-scaffolds* después de 90 días. En el periodo de 45 días, observamos una estructura similar a las trabéculas óseas, en el centro del defecto (Figura 19).

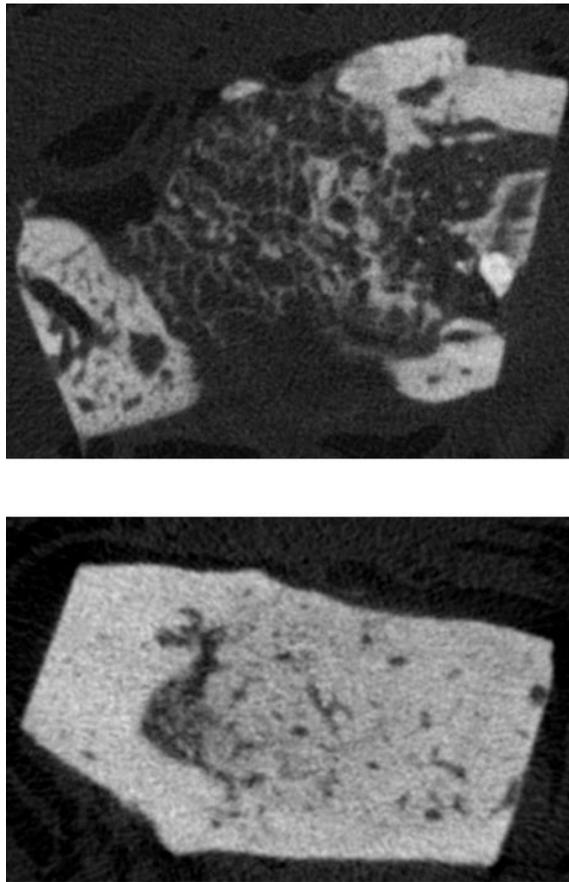


Figura 19: MicroTc. 45 días (arriba). 90 días (abajo)

4.2.5. Cuantificación y análisis estadístico del grado de mineralización

El resultado utilizando *AiOs-scaffolds* durante 90 días está muy cercano a la rBMD. Este resultado es estadísticamente superior comparado con los otros grupos ($p < 0,05$). También observamos que el uso de células mejoraba los resultados respecto a utilizar el *scaffold* solo, cuando se compararon grupos con los mismos periodos. No encontramos rBMD en el grupo control, sin tratamiento. Se muestran los resultados del ANOVA en la tabla 1.

Grupos		Media de las diferencias	p
AiOs-45 días	AiOs-90 días	-0,13881400	0,003
	Scaffold-45 días	0,68275400	<0,0005
	Scaffold-90días	0,36415400	<0,0005
AiOs-90 días	Scaffold-90días	0,50296800	<0,0005
Scaffold-45 días	Scaffold-90días	-0,31860000	<0,0005

Tabla 1. Resultados ANOVA

6. DISCUSIÓN

Existen numerosas demostraciones de que las ASC son los tipos celulares más efectivos y seguros de la medicina regenerativa. No obstante, la creciente investigación en el área de los *scaffolds* biocompatibles amplía el escenario, permitiendo que citoquinas y factores de crecimiento puedan interactuar con ellos y las ASC (Barba et al., 2013).

El limitado éxito de los autoinjertos y aloinjertos, junto con los riesgos derivados de su uso, especialmente en el caso de los primeros, ha dado lugar a la introducción en la clínica de una amplia gama de biomateriales empleados en prometedoras terapias. (Dimitriou et al., 2011). Los modelos de estudio tratan de recrear los mismos factores y medio ambiente presentes durante el desarrollo, cuando tiene lugar la diferenciación celular y la formación de hueso, con la intención de regenerar el tejido óseo tras el nacimiento (Vunjak-Novakovic et al., 2005). En este sentido, se hacen necesarias señales bioquímicas y biofísicas para dar a las células un alojamiento tridimensional que les permita interactuar con las células vecinas y la matriz extracelular. Este conglomerado es lo que permite a la comunidad científica manejar distintas interacciones de *scaffolds*, células y factores de crecimiento, para inducir la regeneración tisular en los defectos óseos (Giannoudis et al., 2008).

Para comprender el complejo mundo de la ingeniería tisular, podemos pensar en un triángulo equilátero, en el que las células mesenquimales, *scaffolds* y las moléculas bioactivas (como factores de crecimiento, etc.) están en los vértices del mismo e interactúan entre sí. Los estudios actuales van encaminados a conocer esos procesos y cómo podemos favorecerlos con nuevos biomateriales o *scaffolds* que permitan el desarrollo del fenotipo deseado a partir de las ASC.

En este estudio mostramos que es posible regenerar hueso en defectos óseos de tamaño crítico practicados en mandíbulas de ratas atímicas utilizando células mesenquimales diferenciadas procedentes de tejido adiposo humano en combinación con *scaffolds* derivados de proteínas del suero humano y glutaraldehído. Observamos que, cuando las ASC son prediferenciadas, el grado de osificación es superior al encontrado con el uso aislado de *scaffold* (Kim et al., 2012; Sunay et al., 2013). Diversos estudios apoyan esta aproximación a la resolución del problema planteado.

De Girolamo (2007 y 2008) demostró, *in vitro*, el potencial diferenciador osteogénico, condrogénico y adipogénico de las ASC. Otros autores han demostrado que las ASC pueden ser aisladas del tejido adiposo de animales, como las ratas (Tholpady, Katz y Ogle, 2003; Kingham et al., 2007; H. Yoshimura et al., 2006), conejos (Peptan, Hong y Mao, 2006; Torres et al., 2007), cerdos (Qu et al., 2007) y caballos (Vidal et al., 2007). Las ASC osteoinducidas y

cargadas en *scaffolds* específicos mostraron gran capacidad de reparación cuando son implantadas en defectos de la bóveda craneal de conejos y ratas (Dudas et al., 2006; E. Yoon et al., 2007) y, recientemente, Tobita et al. (2008) demostraron que, en ratas, la mezcla de ASC con plasma rico en plaquetas (PRP) induce la formación de una estructura similar al ligamento periodontal y al hueso alveolar.

Entre las diferentes aproximaciones al problema de la regeneración ósea con células troncales, se encuentra la preinducción o diferenciación de las ASC colocadas en distintos *scaffolds* y realizados en distintos animales, como hemos llevado a cabo en el presente trabajo. En el estudio de Lin et al. (2006), las ASC fueron recogidas de ratas Sprague-Dawley (SD) y conminadas a diferenciarse en células osteogénicas antes de ser embebidas en un *scaffold* de nano-fosfato bicálcico (NanoBCP) y reimplantadas en ratones atímicos de forma subcutánea. Asimismo, se practicaba en ratas un defecto óseo craneal que se rellenaba con el *scaffold* NanoBCP que contenía las ASC osteoinducidas en el grupo experimental y con el mismo andamiaje libre de células en el grupo control. Se encontró formación de hueso en el grupo ectópico, mientras que, en los grupos con el defecto craneal, hubo una reparación completa en el grupo experimental y solo parcial en el grupo control.

El grupo de Conejero (2006) experimentó con ASC diferenciadas hacia células osteogénicas en un *scaffold* de ácido poliláctico para rellenar defectos de paladar en ratas. Repartieron los animales del estudio en 4 grupos, de acuerdo con el tipo de injerto colocado en el defecto. Así distinguieron los siguientes grupos: grupo I en el que el defecto se deja vacío, grupo II en el que se coloca el *scaffold* sin células, grupo III, tratado con *scaffold* y células ASC no diferenciadas, y grupo IV en el que se implanto el *scaffold* células ASC diferenciadas osteogénicamente. En los grupos I, II y III, el defecto se rellenó de tejido fibroso, mientras que en el grupo IV hubo una sustanciosa regeneración ósea.

Kim et al. (2010) utilizaron *scaffolds* de composites de policaprolactona-ácido poliláctico-glicólico y TCP (fosfato tricálcico) en los que se anclaron células osteogénicas diferenciadas a partir de ASC y células endoteliales de la vena umbilical, implantados en defectos craneales en ratas. Realizaron los análisis a las 8 y 12 semanas y dedujeron que los defectos con mayor área de hueso neoformado correspondían al grupo con dicho *scaffold*, por encima del grupo donde se colocaron únicamente las ASC diferenciadas, en el que también se formó hueso, aunque en menor medida.

S. J. Yoon et al. (2007), por su parte, estudiaron el efecto en la regeneración ósea con *scaffolds* de ácido poliláctico-glicólico, en los que se introdujeron ASC humanas diferenciadas e implantadas en defectos parietales de 8 mm en 27 ratas atímicas. Los animales se

distribuyeron en 3 grupos según que el *scaffold* estuviera vacío, relleno de ASC humanas sin diferenciar o con ASC diferenciadas. Los resultados confirman que el grupo que contenía el *scaffold* y las ASC diferenciadas contenía más cantidad y hueso más denso que cuando se empleaban ASC sin diferenciar.

Cui et al. (2007), por su parte, consideraron como factor limitante de su aplicabilidad en la clínica humana que la mayor parte de los estudios publicados anteriormente habían sido hechos en modelos animales de pequeño tamaño y con un tiempo de seguimiento corto. En su estudio analizaron la viabilidad del uso de ASC (autólogas) en *scaffold* de coral para reparar defectos parietales en perros y con un seguimiento de al menos 6 meses. Realizaron defectos bilaterales de 20 mm en los huesos parietales, que se rellenaron con *scaffold* de coral vacíos en el grupo control, y cargados de ASC en el grupo experimental. Los resultados confirman que, aunque en los dos grupos se formó hueso, la reparación fue más completa en el lado experimental.

Di Bella, Farlie y Penington (2008) evaluaron la capacidad de las ASC autólogas en combinación con un *scaffold* de ácido poliláctico (PLA) para regenerar defectos óseos en el esqueleto de conejos blancos de Nueva Zelanda. Repartieron 30 animales en 6 grupos de 5 ejemplares cada uno. El grupo I (control) fue tratado con PLA solo, el grupo II con PLA recubierto con fibronectina, el grupo III con PLA y ASC, el grupo IV con PLA recubierta de fibronectina y con ASC, el grupo V con PLA con ASC inducidas osteogénicamente y, finalmente, el grupo VI con PLA recubierto de fibronectina con ASC inducidas osteogénicamente. Este último grupo fue el que mostró mayor formación de hueso. También se observaron que, en los grupos en los que el *scaffold* estaba cubierto de fibronectina mejoraba la neoformación de hueso.

Dudas et al. (2006) diseñaron un estudio para evaluar el potencial osteogénico de las ASC a la hora de regenerar defectos craneales en conejos. Testaron la eficacia de *scaffolds* de espuma de gelatina (GF) con ASC autólogas diferenciadas junto con proteínas morfogenéticas BMP-2. Produjeron defectos craneales de 8 mm y los trataron en diferentes formas: unos fueron dejados vacíos y otros rellenos con un autoinjerto, con el *scaffold* de GF, con GF y ASC, y con GF con ASC diferenciadas. Después de 6 semanas, los defectos tratados con el autoinjerto se habían reparado de forma completa y aquellos que tenían ASC osteoinducidas exhibieron mejores resultados que las que tenían ASC no inducidas.

El estudio de Kim et al. (2012) evaluó la capacidad osteogénica de las ASC inducidas osteogénicamente. Utilizó 40 ratas SD, en 4 grupos de 10 animales cada uno, en los que se realizaron defectos críticos circulares de 8 mm en la calota. Los tratamientos aplicados a los

mismos, fueron: un grupo control, sin tratamiento; un grupo con la matriz desmineralizada, un grupo con la matriz y ASC no inducidas y un último grupo con la matriz y las ASC inducidas osteogénicamente. Los animales fueron sacrificados a las 8 semanas de la implantación y se hicieron análisis radiográficos e histológicos confirmando que los defectos estaban más reparados en el grupo donde se habían incluido las ASC inducidas, en comparación con los otros grupos.

En otra línea, el estudio de Stockmann et al. (2011) estaba orientado a comparar, *in vivo*, el potencial osteogénico de las ASC y de las células mesenquimales procedentes del periostio (PD-MS) y de la médula ósea (BM-MS). Todas fueron osteogénicamente inducidas y fijadas en un *scaffold* de colágeno y, posteriormente, colocadas en defectos craneales monocorticales, creados en 21 cerdos. Después de ser sacrificados, se reveló que en los primeros estadios de la cicatrización, hasta pasados 30 días, no se encontraron diferencias entre los distintos grupos, pero en la parte final de aquella, la regeneración ósea se aceleraba en los grupos experimentales. De hecho, todos los defectos experimentales estaban totalmente reparados al cabo de 90 días. Estos resultados indican que la eficacia de la implantación de células ASC, PD-MS y BM-MS autólogas no presentaba diferencias significativas en la reparación de defectos óseos.

En otro grupo de estudios se emplean ASC no inducidas a estipes osteogénicas. A este grupo pertenece el trabajo de Streckbein et al. (2013), donde se evalúa la reparación de defectos de tamaño crítico en mandíbulas de ratas atímicas, mediante el relleno de los mismos con ASC humanas embebidas en fibrina, comparada con la de defectos rellenos con un injerto autólogo. Como control, se emplearon defectos carentes de relleno. Se observó que los defectos tratados con ASC humanas se repararon adecuadamente.

En el estudio de Levi et al. (2010), se intenta justificar el uso de ASC humanas en la reparación de defectos óseos críticos craneales en ratones. Recogen hASC de lipoaspirados, y crean defectos críticos de 4 mm en los huesos parietales de ratones atímicos machos. Los defectos se rellenan bien con un *scaffold* de apatita impregnado con PLGA (ácido poliláctico co-glicólico), con *scaffold* con hASC o, simplemente, se dejaron vacíos. Se observó una reparación, prácticamente total, en el caso del *scaffold* con las hASC, por lo que estos autores defienden que no es necesaria la prediferenciación de las ASC para la regeneración ósea de estos defectos de tamaño crítico.

Otros estudios como el de Wang et al. (2010) se basan en la hipótesis de que sustancias como el alendronato (Aln) pueden actuar como factor osteoinductor en la diferenciación osteogénica de las hASC. *In vitro*, el efecto del Aln en la capacidad osteogénica

de las hASC se testó mediante el estudio de la mineralización y de la actividad de la fosfatasa alcalina. *In vivo*, el efecto de la administración local de Aln en la reparación ósea se examinó en defectos craneales de 7 mm practicados en ratas. Los defectos se rellenaron con hASC en un *scaffold* de PLGA y se inyectaron localmente en el defecto 5 uM/100 ul/día durante una semana. El nuevo hueso formado se evaluó radiográficamente y con análisis histológico a las 8 y 12 semanas. Los resultados demostraron que esta administración local del Aln actúa como un potente factor osteoinductor, aumentando la actividad osteogénica de las hASC y la regeneración ósea.

Wilson, Butler y Seifalian (2011), a su vez, investigaron el efecto de las ASC inyectadas local o sistémicamente en la regeneración ósea de defectos no-críticos de 10 mm de diámetro en la rama mandibular de 15 cerdos Yorkshire. Los animales recibieron 3 tipos de tratamiento. El grupo 1 recibió una inyección de 2,5 millones diacetato de carboxifluoresceína succinimidil éster con ASC de un cerdo donante, directamente dentro del defecto (grupo 1) o de 5 millones de la misma solución en una vena de la oreja (grupo 2), o de un cultivo de DMEM sin células en la misma vena (grupo 3). Se sacrificaron los animales de cada grupo al cabo de 1 hora, 2 semanas y 4 semanas después de la cirugía. La cicatrización ósea en los grupos donde las ASC estaban tratadas con las inyecciones fue más rápida en comparación con el grupo control.

El grado de mineralización obtenido con los *scaffolds* desnudos podría explicarse tanto por el hecho de que la albúmina incorpora calcio como por la capacidad osteoconductiva del *scaffold* debido a la porosidad de su estructura. En el análisis estructural, histológico y radiológico, observamos una mejor organización en osteonas cuando se utilizan células y, mejor aún, en el periodo de 90 días, predominando el tejido osteoide a los 45 días (Conejero et al., 2006).

Las propiedades de los *scaffolds* son importantes para la formación de hueso e influye el tamaño, distribución y forma de los poros, rugosidad de superficie, presencia de espacio adecuado para alojar a las células y las propiedades biomecánicas del material (Hofmann et al., 2007; Dalby et al., 2007; Comisar et al., 2007; Engler et al., 2006). La mayor parte de los *scaffolds* están fabricados con material osteoconductivo, como proteínas óseas e HA.

También pueden incorporar y controlar la entrega de moléculas bioactivas, tales como los factores de crecimiento, que regulan la función celular, acelerando la cicatrización y previniendo patologías (Karageorgiou et al., 2006; Janicki y Schmidmaier, 2011). La porosidad del *scaffold* es primordial en la revascularización, adhesión y proliferación celular (Mohan et al., 2013). En nuestro caso, el tamaño del poro era óptimo, entre 50 y 150 micras.

El *scaffold* debe ser reemplazado, con el tiempo, por hueso neoformado, por lo que deben estar contruidos con materiales reabsorbibles o materiales que se degraden de forma hidrolítica o enzimática, como los polímeros, o que puedan ser disueltos por células como los osteoclastos (Schmidt-Rohlfing et al., 2009; Liao y Cui, 2004). Muchos materiales se han descrito como soporte *in vitro* para la formación de hueso con células humanas, incluyendo biocerámicas como las HA, β -TCP, biocristales y polímeros biodegradables (Mygind et al., 2007; Boukhechba et al., 2009), colágeno natural o sintético, fibrina, quitosan o poliésteres (Boukhechba et al., 2009; Meinel et al., 2004). Los *scaffolds* que contienen compuestos de estos materiales combinan las ventajas de las cerámicas bioactivas y de los polímeros biodegradables (Chesnutt et al., 2009; Wahl y Czernuszka, 2006; Li, Feng y Cui, 2006; Liao, Cui y Zhu, 2004; Zhang et al., 2011). En nuestro estudio, al final de los 90 días, partes del *scaffold* persistían, lo que es útil, ya que la reabsorción lenta del *scaffold* permitió a las células proliferar de forma adecuada (Hollinger y Battistone, 1986; Gao et al., 2005).

Otro factor importante es la contribución activa de las células injertadas. Esto se deduce de la diferencia, estadísticamente significativa, entre los grupos; y la presencia positiva de vimentina en células humanas (Mohan et al., 2013). No encontramos positividad para vimentina en las células del huésped; sin embargo, hay poblaciones celulares que no se tiñen con este reactivo, o se tiñen poco en grupos con largos períodos postoperatorios. Esto sugiere que parte de la regeneración ósea ocurre a expensas de la contribución de las células del huésped (Levi et al., 2010), lo que podría evidenciar la capacidad osteoinductiva y osteoconductiva del tratamiento propuesto. Es conocido que la sola contribución de las células del huésped no es suficiente para regenerar hueso (Kübler et al., 1995; Clokie et al., 2002), hecho confirmado con nuestros resultados, así como el hecho de que el grado de mineralización y regeneración sea más pobre usando el *scaffold* solo.

El uso del *scaffold* solo no conduce a un resultado estructuralmente estable, como nos revela el estudio histológico. Por esta razón pensamos, igual que otros autores, que las células contribuyen a la estabilidad del *scaffold* en defectos óseos (Choi et al., 2011). Cuando no se usa ningún tratamiento, el huésped no es capaz de regenerar los defectos por sí mismo, en los períodos de tiempo analizados. Esto indica que el tamaño del defecto es crítico, y que su regeneración se alcanza solo cuando se aplica el tratamiento recomendado.

Los resultados obtenidos con STRO-1 no son suficientes para establecer conclusiones con respecto a este marcador y ASC. Parece que STRO-1 puede estar relacionada con una subpoblación con mayor capacidad osteogénica (Rada et al., 2012). Solo encontramos células STRO-1 positivas cuando se trató el defecto con AiOs durante 45 días. Posteriormente, estas

células perdieron positividad. Estos hallazgos pueden ser explicados asumiendo la hipótesis de que la diferenciación celular previa acontecida *in vitro* no es completa, de modo que las células estarían en un estadio intermedio de diferenciación, y que esta sería solo completa tras su presencia en un organismo vivo. Esto explicaría la positividad inicial a los 45 días y su ausencia a los 90 días.

7. CONCLUSIONES

- Es posible aislar ASC, válidas para regeneración ósea, a partir de tejido adiposo.
- Es posible inducir la diferenciación de las ASCs a células osteogénicas *in vitro*.
- Es posible regenerar hueso con esta estirpe celular diferenciada, en combinación con *scaffolds* de suero humano y glutaraldehído.
- El hueso regenerado presenta, a los 90 días, una estructura similar al hueso maduro nativo.
- Las células injertadas participan activamente en la regeneración ósea y el resultado es dependiente de ellas.
- Las células injertadas perduran, al menos, durante 45 días.
- El *scaffold* es adecuado para soportar esta línea celular, es osteoconductor y sirve de soporte adecuado para la proliferación celular y la revascularización.
- El *scaffold* es fácil de construir y puede ser autólogo.
- El proceso de reabsorción del *scaffold* es adecuado en forma y tiempo para la regeneración ósea.
- La integración del *scaffold* en el huésped depende de la presencia de células.
- El *scaffold*, por sí mismo, no es capaz de promover la regeneración ósea.
- No se ha observado regeneración en los defectos no tratados, lo que demuestra que los defectos han sido de tamaño crítico.

8. BIBLIOGRAFÍA

A

- Amini, A. R., Laurencin, C. T., y Nukavarapu, S. P. (2012). Bone tissue engineering: recent advances and challenges. *Critical Reviews in Biomedical Engineering*, 40(5), 363-408.
- Alvarez-Barreto, J. F., Sikavitsas, V. I. (2007). Improved mesenchymal stem cell seeding on RGD-modified poly(L-lactic acid) scaffolds using flow perfusion. *Macromolecular Bioscience*, 7(5), 579-588. doi:10.1002/mabi.200600280
- Arribas García de León, M. I. (2014). *Plasticidad diferencial de distintos clones de células madre mesenquimales aisladas de lipoaspirados humanos*, tesis doctoral dirigida por los doctores Enrique Rocha Collado y Alfredo Santana Rodríguez, Instituto de Bioingeniería, Universidad Miguel Hernández (Elche). [En línea: <<http://dspace.umh.es/handle/11000/1680>>; consulta: 15-02-2017.]
- Arrigoni, E., Lopa, S., De Girolamo, L., Stanco, D., y Brini, A. T. (2009). Isolation, characterization and osteogenic differentiation of adipose-derived stem cells: from small to large animal models. *Cell and Tissue Research*, 338(3), 401-411. doi:10.1007/s00441-009-0883-x
- Ashjian, P. H., Elbarbary, A. S., Edmonds, B., De Ugarte, D., Zhu, M., Zuk, P. A., [...] y Hedrick, M. H. (2003). In vitro differentiation of human processed lipoaspirate cells into early neural progenitors. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 111(6), 1922-1931. doi:10.1097/01.PRS.0000055043.62589.05
- Asti, A., Gastaldi, G., Dorati, R., Saino, E., Conti, B., Visai, L., y Benazzo, F. (2010). Stem cells grown in osteogenic medium on PLGA, PLGA/HA, and titanium scaffolds for surgical applications. *Bioinorganic Chemistry and Applications*, 831031. doi:10.1155/2010/831031
- Aurich, I., Mueller, L. P., Aurich, H., Luetzkendorf, J., Tisljar, K., Dollinger, M. M., [...] y Christ, B. (2007). Functional integration of hepatocytes derived from human mesenchymal stem cells into mouse livers. *Gut*, 56(3), 405-415. doi:10.1136/gut.2005.090050

B

- Baer, P. C., y Geiger, H. (2012). Adipose-derived mesenchymal stromal/stem cells: tissue localization, characterization, and heterogeneity. *Stem Cells International*, 2012, 812693. doi:10.1155/2012/812693
- Banas, A., Teratani, T., Yamamoto, Y., Tokuhara, M., Takeshita, F., Quinn, G., [...] y Ochiya, T. (2007). Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells as a source of human hepatocytes. *Hepatology*, 46(1), 219-228. doi:10.1002/hep.21704
- Barba, M., Cicione, C., Bernardini, C., Michetti, F., y Lattanzi, W. (2013). Adipose-derived mesenchymal cells for bone regeneration: state of the art. *BioMed Research International*, 416391. doi:10.1155/2013/416391
- Barba, M., Pirozzi, F., Saulnier, N., Vitali, T., Natale, M. T., Logroscino, G., [...] y Lattanzi, W. (2012). Lim mineralization protein 3 induces the osteogenic differentiation of human amniotic fluid stromal cells through Kruppel-like factor-4 downregulation and further bone-specific gene expression. *Journal of Biomedicine & Biotechnology*, 2012, 813894. doi:10.1155/2012/813894
- Barry, F. P. (2003). Biology and clinical applications of mesenchymal stem cells. *Birth Defects Research. Part C: Embryo Today*, 69(3), 250-256. doi:10.1002/bdrc.10021
- Behr, B., Tang, C., Germann, G., Longaker, M. T., y Quarto, N. (2011). Locally applied vascular endothelial growth factor A increases the osteogenic healing capacity of human adipose-derived stem cells by promoting osteogenic and endothelial differentiation. *Stem Cells*, 29(2), 286-296. doi:10.1002/stem.581
- Bellucci, D., Sola, A., y Cannillo, V. (2011). A revised replication method for bioceramic scaffolds. *Bioceramics Development and Applications*, 1, 1-8. doi:10.4303/bda/D110401
- Bodle, J. C., Hanson, A. D., y Lobo, E. G. (2011). Adipose-derived stem cells in functional bone tissue engineering: lessons from bone mechanobiology. *Tissue Engineering. Part B: Reviews*, 17(3), 195-211. doi:10.1089/ten.teb.2010.0738
- Bose, S., Roy, M., y Bandyopadhyay, A. (2012). Recent advances in bone tissue engineering scaffolds. *Trends in Biotechnology*, 30(10), 546-554. doi:10.1016/j.tibtech.2012.07.005

- Boukhechba, F., Balaguer, T., Michiels, J. F., Ackermann, K., Quincey, D., Bouler, J. M., [...] y Rochet, N. (2009). Human primary osteocyte differentiation in a 3D culture system. *Journal of Bone and Mineral Research*, 24(11), 1927-1935. doi:10.1359/jbmr.090517
- Brzoska, M., Geiger, H., Gauer, S., y Baer, P. (2005). Epithelial differentiation of human adipose tissue-derived adult stem cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 330(1), 142-150. doi:10.1016/j.bbrc.2005.02.141
- Bunnell, B. A., Flaate, M., Gagliardi, C., Patel, B., y Ripoll, C. (2008). Adipose-derived stem cells: isolation, expansion and differentiation. *Methods*, 45(2), 115-120. doi:10.1016/j.ymeth.2008.03.006
- Butler, D. L., Goldstein, S. A., y Guilak, F. (2000). Functional tissue engineering: the role of biomechanics. *Journal of Biomechanical Engineering*, 122(6), 570-575. doi:10.1115/1.1318906

C

- Cai, L., Johnstone, B. H., Cook, T. G., Tan, J., Fishbein, M. C., Chen, P. S., y March, K. L. (2009). IFATS collection: Human adipose tissue-derived stem cells induce angiogenesis and nerve sprouting following myocardial infarction, in conjunction with potent preservation of cardiac function. *Stem Cells*, 27(1), 230-237. doi:10.1634/stemcells.2008-0273
- Caplan, A. I. (1991). Mesenchymal stem cells. *Journal of Orthopaedic Research*, 9, 641-650. doi:10.1002/jor.1100090504
- Caplan, A. I. (2007). Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. *Journal of Cellular Physiology*, 213(2), 341-347. doi:10.1002/jcp.21200
- Casadei, A., Epis, R., Ferroni, L., Tocco, I., Gardin, C., Bressan, E., [...] y Zavan, B. (2012). Adipose tissue regeneration: A state of the art. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2012, 462543. doi: 10.1155/2012/462543
- Casteilla, L., Planat-Benard, V., Laharrague, P., y Cousin, B. (2011). Adipose-derived stromal cells: their identity and uses in clinical trials, an update. *World Journal of Stem Cells*, 3(4), 25-33. doi:10.4252/wjsc.v3.i4.25
- Centro Comunitario de Sangre y Tejidos de Asturias, y Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas. V. Meana et al.

- Chang, P.-C., Liu, B.-Y., Liu, C.-M., Chou, H.-H., Ho, M.-H., Liu, H.-C., [...] y Hou, L.-T. (2007). Bone tissue engineering with novel rhBMP2-PLLA composite scaffolds. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A*, 81(4), 771-780. doi:10.1002/jbm.a.31031
- Chao, Y. H., Wu, H. P., Chan, C. K., Tsai, C., Peng, C. T., y Wu, K. H. (2012). Umbilical cord-derived mesenchymal stem cells for hematopoietic stem cell transplantation. *Journal of Biomedicine & Biotechnology*, 2012, 759503. doi:10.1155/2012/759503
- Chen, H.-T., Lee, M.-J., Chen, C.-H., Chuang, S.-C., Chang, L.-F., Ho, M.-L., [...] y Chang, J.-K. (2012). Proliferation and differentiation potential of human adipose-derived mesenchymal stem cells isolated from elderly patients with osteoporotic fractures. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 16(3), 582-593. doi:10.1111/j.1582-4934.2011.01335.x
- Chesnutt, B. M., Yuan, Y., Buddington, K., Haggard, W. O., y Bumgardner, J. D. (2009). Composite chitosan/nano-hydroxyapatite scaffolds induce osteocalcin production by osteoblasts in vitro and support bone formation in vivo. *Tissue Engineering. Part A*, 15(9), 2571-2579. doi:10.1089/ten.tea.2008.0054
- Choi, H. J, Kim, J. M., Kwon, E., Che, J.-H., Lee, J.-I., Cho, S.-R., [...] y Kang, B. C. (2011). Establishment of efficacy and safety assessment of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells (hATMSC) in a nude rat femoral segmental defect model. *Journal of Korean Medical Science*, 26, 482-491. doi:10.3346/jkms.2011.26.4.482.
- Clokie, C. M., Moghadam, H., Jackson, M. T., y Sandor, G. K. (2002). Closure of critical sized defects with allogenic and alloplastic bone substitutes. *The Journal of Craniofacial Surgery*, 13(1), 111-123.
- Comisar, W. A., Kazmers, N. H., Mooney, D. J., y Linderman, J. J. (2007). Engineering RGD nanopatterned hydrogels to control preosteoblast behavior: a combined computational and experimental approach. *Biomaterials*, 28(30), 4409-4417. doi:10.1016/j.biomaterials.2007.06.018
- Conejero, J. A., Lee, J. A., Parrett, B. M., Terry, M., Wear-Maggitti, K., Grant, R. T., y Breitbart, A. S. (2006). Repair of palatal bone defects using osteogenically differentiated fat-derived stem cells. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 117(3), 857-863. doi:10.3109/14653249.2011.627915

Cowan, C. M., Shi, Y.-Y., Aalami, O. O., Chou, Y.-F., Mari, C., Thomas, R., [...] y Longaker, M. T. (2004). Adipose-derived adult stromal cells heal critical-size mouse calvarial defects. *Nature Biotechnology*, 22(5), 560-567. doi:10.1038/nbt958

Cristino, S., Grassi, F., Toneguzzi, S., Piacentini, A., Grigolo, B., Santi, S., [...] y Lisignoli, G. (2005). Analysis of mesenchymal stem cells grown on a three-dimensional HYAFF 11-based prototype ligament scaffold. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A*, 73(3), 275-283. doi:10.1002/jbm.a.30261

Cui, L., Liu, B., Liu, G., Zhang, W., Cen, L., Sun, J., [...] y Cao, Y. (2007). Repair of cranial bone defects with adipose derived stem cells and coral scaffold in a canine model. *Biomaterials*, 28(36), 5477-5486. doi:10.1016/j.biomaterials.2007.08.042

D

Dalby, M. J., Gadegaard, N., Tare, R., Andar, A., Riehle, M. O., Herzyk, P., [...] y Oreffo, R. O. (2007). The control of human mesenchymal cell differentiation using nanoscale symmetry and disorder. *Nature Materials*, 6(12), 997-1003. doi:10.1038/nmat2013

De Coppi, P., Bartsch, G. Jr., Siddiqui, M. M., Xu, T., Santos, C. C., Perin, L., [...] y Atala, A. (2007). Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy. *Nature Biotechnology*, 25(1), 100-106. doi:10.1038/nbt1274

De Girolamo, L., Sartori, M. F., Albisetti, W., y Brini, A. T. (2007). Osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells: comparison of two different inductive media. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 1(2), 154-157. doi:10.1002/term.12

De Girolamo, L., Sartori, M. F., Arrigoni, E., Rimondini, L., Albisetti, W., Weinstein, R. L., y Brini, A. T. (2008). Human adipose-derived stem cells as future tools in tissue regeneration: osteogenic differentiation and cell-scaffold interaction. *International Journal of Artificial Organs*, 31(6), 467-479.

De Ugarte, D. A., Morizono, K., Elbarbary, A., Alfonso, Z., Zuk, P. A., Zhu, M., [...] y Hedrick, M. H. (2003). Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow. *Cells, Tissues, Organs*, 174(3), 101-109.

Deng, Y., Zhou, H., Zou, D., Xie, Q., Bi, X., Gu, P., y Fan, X. (2013). The role of miR-31-modified adipose tissue-derived stem cells in repairing rat critical-sized calvarial defects. *Biomaterials*, 34(28), 6717-6728. doi:10.1016/j.biomaterials.2013.05.042

- Di Bella, C., Farlie, P., y Penington, A. J. (2008). Bone regeneration in a rabbit critical-sized skull defect using autologous adipose-derived cells. *Tissue Engineering*, 14(4), 483-490. doi:10.1089/tea.2007.0137
- Dimitriou, R., Jones, E., McGonagle, D., y Giannoudis, P. V. (2011). Bone regeneration: current concepts and future directions. *BMC Medicine*, 9(1), 66. doi:10.1186/1741-7015-9-66
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., [...] y Horwitz, E. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8(4), 315-317. doi:10.1080/14653240600855905
- Drosse, I., Volkmer, E., Capanna, R., De Biase, P., Mutschler, W., y Schieker, M. (2008). Tissue engineering for bone defect healing: an update on a multi-component approach. *Injury*, 39 (supl. 2), S9-S20. doi:10.1016/S0020-1383(08)70011-1
- Dudas, J. R., Marra, K. G., Cooper, G. M., Penascino, V. M., Mooney, M. P., Jiang, S., [...] y Losee, J. E. (2006). The osteogenic potential of adipose-derived stem cells for the repair of rabbit calvarial defects. *Annals of Plastic Surgery*, 56(5), 543-548. doi:10.1097/01.sap.0000210629.17727.bd

E

- Engler, A. J., Sen, S., Sweeney, H. L., y Discher, D. E. (2006). Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell*, 126(4), 677-689. doi:10.1016/j.cell.2006.06.044

F

- Fang, X., Murakami, H., Demura, S., Hayashi, K., Matsubara, H., Kato, S., [...] y Tsuchiya, H. (2014). A novel method to apply osteogenic potential of adipose derived stem cells in orthopaedic surgery. *PLoS ONE*, 9(2). doi:10.1371/journal.pone.0088874
- Feng, Z., Yamato, M., Akutsu, T., Nakamura, T., Okano, T., y Umezumi, M. (2003). Investigation on the mechanical properties of contracted collagen gels as a scaffold for tissue engineering. *Artificial Organs*, 27(1), 84-91. doi:10.1046/j.1525-1594.2003.07187.x
- Ferreira, J. R., Padilla, R., Urkasemsin, G., Yoon, K., Goeckner, K., Hu, W.-S., y Ko, C.-C. (2013). Titanium-enriched hydroxyapatite-gelatin scaffolds with osteogenically

differentiated progenitor cell aggregates for calvaria bone regeneration. *Tissue Engineering. Part A*, 19(15-16), 1803-1816. doi:10.1089/ten.TEA.2012.0520

Fortunel, N. O., Otu, H. H., Ng, H. H., Chen, J., Mu, X., Chevassut, T., [...] y Lim, B. (2003). Comment on " 'Stemness': transcriptional profiling of embryonic and adult stem cells" and "A stem cell molecular signature". *Science*, 302(5644), 393; respuesta del autor, 393. doi:10.1126/science.1086384

Frank, O., Heim, M., Jakob, M., Barbero, A., Schäfer, D., Bendik, I., [...] y Martin, I. (2002). Real-time quantitative RT-PCR analysis of human bone marrow stromal cells during osteogenic differentiation *in vitro*. *Journal of Cell Biochemistry*, 85, 737-746. doi:10.1002/jcb.10174

Fraser, J. K., Schreiber, R., Strem, B., Zhu, M., Alfonso, Z., Wulur, I., y Hedrick, M. H. (2006). Plasticity of human adipose stem cells toward endothelial cells and cardiomyocytes. *Nature Clinical Practice Cardiovascular Medicine*, 3 (sup. 1), S33-37. doi:10.1038/ncpcardio0444

Friedenstein, A. J., Chailakhjan, R. K., y Lalykina, K. S. (1970). The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell and Tissue Kinetics*, 3(4), 393-403. doi:10.1111/j.1365-2184.1970.tb00347.x

Fujimura, J., Ogawa, R., Mizuno, H., Fukunaga, Y., y Suzuki, H. (2005). Neural differentiation of adipose-derived stem cells isolated from GFP transgenic mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 333(1), 116-121. doi:10.1016/j.bbrc.2005.05.096

Funk, J. F., Matziolis, G., Krockner, D., y Perka, C. (2007). Promotion of bone healing through clinical application of autologous periosteum derived stem cells in a case of atrophic non-union. *Zeitschrift für Orthopädie und Unfallchirurgie*, 145(6), 790-794. doi:10.1055/s-2007-965686

G

Gallego, L., Junquera, L., García, E., García, V., Álvarez-Viejo, M., Costilla, S., [...] y Meana, Á. (2010). Repair of rat mandibular bone defects by alveolar osteoblasts in a novel plasma-derived albumin scaffold. *Tissue Engineering. Part A*, 16(4), 1179-1187. doi:10.1089/ten.TEA.2009.0517

- Gallego, L., Junquera, L., Meana, Á., Álvarez-Viejo, M., y Fresno, M. (2010). Ectopic bone formation from mandibular osteoblasts cultured in a novel human serum-derived albumin scaffold. *Journal of Biomaterials Applications*, 25(4), 367-381.
- Gao, C., Gao, J., You, X., Huo, S., Li, X., Zhang, Y., y Zhang, W. (2005). Fabrication of calcium sulfate/PLLA composite for bone repair. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A*, 73A(2), 244-253. doi:10.1002/jbm.a.30283
- García Olmo, D., y García Arranz, M. (2009). Células progenitoras multipotentes obtenidas del tejido adiposo y su aplicación clínica. En F. de Pablo Dávila y M. Cascales Angosto (eds.), *Células madre y terapia regenerativa* (pp. 197-221). Madrid: Real Academia Nacional de Farmacia.
- Giannoudis, P. V., Einhorn, T. A., Schmidmaier, G., y Marsh, D. (2008). The diamond concept – open questions. *Injury*, 39 (supl. 2), S5-8. doi:10.1016/S0020-1383(08)70010-X
- Gimble, J. M., Bunnell, B. A., Frazier, T., Rowan, B., Shah, F., Thomas-Porch, C., y Wu, X. (2013). Adipose-derived stromal/stem cells: a primer. *Organogenesis*, 9(1), 3-10. doi:10.4161/org.24279
- Gimble, J. M., y Guilak, F. (2003). Adipose-derived adult stem cells: isolation, characterization, and differentiation potential. *Cytotherapy*, 5(5), 362-369. doi:10.1080/14653240310003026
- Gimble, J. M., Katz, A. J., y Bunnell, B. A. (2007). Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circulation Research*, 100(9), 1249-1260. doi:10.1161/01.RES.0000265074.83288.09
- Griffin, M., Kalaskar, D. M., Butler, P. E., y Seifalian, A. M. (2014). The use of adipose stem cells in cranial facial surgery. *Stem Cell Reviews and Reports*, 10(5), 671-685. doi:10.1007/s12015-014-9522-3
- Gronthos, S., Franklin, D. M., Leddy, H. A., Robey, P. G., Storms, R. W., y Gimble, J. M. (2001). Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells. *Journal of Cellular Physiology*, 189, 54-63. doi:10.1002/jcp.1138

- Hadjizadeh, A., y Doillon, C. J. (2010). Directional migration of endothelial cells towards angiogenesis using polymer fibres in a 3D co-culture system. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 4(7), 524-531. doi:10.1002/term.269
- Han, D. S., Chang, H. K., Kim, K. R., y Woo, S. M. (2014). Consideration of bone regeneration effect of stem cells: comparison of bone regeneration between bone marrow stem cells and adipose-derived stem cells. *The Journal of Craniofacial Surgery*, 25(1), 196-201. doi:10.1097/SCS.0000000000000378
- Hattori, H., Masuoka, K., Sato, M., Ishihara, M., Asazuma, T., Takase, B., [...], e Ishihara, M. (2006). Bone formation using human adipose tissue-derived stromal cells and a biodegradable scaffold. *Journal of Biomedical Materials Research. Part B: Applied Biomaterials*, 76, 230-239. doi:10.1002/jbm.b.30357
- Helder, M. N., Knippenberg, M., Klein-Nulend, J., y Wuisman, P. I. J. M. (2007). Stem cells from adipose tissue allow challenging new concepts for regenerative medicine. *Tissue Engineering*, 13(8), 1799-1808. doi:10.1089/ten.2006.0165
- Hench, L. L. (1991). Bioceramics: from concept to clinic. *Journal of the American Ceramic Society*, 74, 1487-1510. doi:10.1111/j.1151-2916.1991.tb07132.
- Hench, L. L. (2006). The story of Bioglass. *Journal of Material Science: Materials in Medicine*, 17(11), 967-978. doi:10.1007/s10856-006-0432-z
- Hicok, K. C., Du Laney, T. V., Zhou, Y. S., Halvorsen, Y. D., Hitt, D. C., Cooper, L. F., y Gimble, J. M. (2004). Human adipose-derived adult stem cells produce osteoid *in vivo*. *Tissue Engineering*, 10(3/4), 371-380. doi:10.1089/107632704323061735
- Hofmann, S., Hagenmüller, H., Koch, A. M., Müller, R., Vunjak-Novakovic, G., Kaplan, D. L., [...] y Meinel, L. (2007). Control of *in vitro* tissue-engineered bone-like structures using human mesenchymal stem cells and porous silk scaffolds. *Biomaterials*, 28(6), 1152-1162. doi:10.1016/j.biomaterials.2006.10.019
- Hollinger, J. O., y Battistone, G. C. (1986). Biodegradable bone repair materials: synthetic polymers and ceramics. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 207, 290-305.

I

- Ishaug, S. L., Crane, G. M., Miller, M. J., Yasko, A. W., Yaszemski, M. J., y Mikos, A. G. (1997). Bone formation by three-dimensional stromal osteoblast culture in biodegradable polymer scaffolds. *Journal of Biomedical Materials Research*, 36(1), 17-28. doi:10.1002/(SICI)1097-4636(199707)36:1<17::AID-JBM3>3.0.CO;2-O
- Ishaug, S. L., Yaszemski, M. J., Bizios, R., y Mikos, A. G. (1994). Osteoblast function on synthetic biodegradable polymers. *Journal of Biomedical Materials Research*, 28(12), 1445-1453. doi:10.1002/jbm.820281210

J

- Jäger, M., Jelinek, E. M., Wess, K. M., Scharfstädt, A., Jacobson, M., Kevy, S. V., y Krauspe, R. (2009). Bone marrow concentrate: a novel strategy for bone defect treatment. *Current Stem Cell Research & Therapy*, 4(1), 34-43. doi:10.2174/157488809787169039
- Janicki, P., y Schmidmaier, G. (2011). What should be the characteristics of the ideal bone graft substitute? Combining scaffolds with growth factors and/or stem cells. *Injury*, 42(supl. 2), S77-81. doi: 10.1016/j.injury.2011.06.014
- Janning, C., Willbold, E., Vogt, C., Nellesen, J., Meyer-Lindenberg, A., Windhagen, H., [...] y Witte, F. (2010). Magnesium hydroxide temporarily enhancing osteoblast activity and decreasing the osteoclast number in peri-implant bone remodelling. *Acta Biomaterialia*, 6(5), 1861-1868. doi: 10.1016/j.actbio.2009.12.037
- Jeon, O., Rhie, J. W., Kwon, I. K., Kim, J. H., Kim, B. S., y Lee, S. H. (2008). *In vivo* bone formation following transplantation of human adipose-derived stromal cells that are not differentiated osteogenically. *Tissue Engineering. Part A*, 14, 1285-1294. doi:10.1089/ten.tea.2007.0253
- Johnstone, B., Hering, T. M., Caplan, A. I., Goldberg, V. M., y Yoo, J. U. (1998). *In vitro* chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Experimental Cell Research*, 238(1), 265-272. doi:10.1006/excr.1997.3858
- Jurgens, W., Kroeze, R., Bank, R. A., Ritt, M. J., y Helder, M. N. (2011). Rapid attachment of adipose stromal cells on resorbable polymeric scaffolds facilitates the one-step surgical procedure for cartilage and bone tissue engineering purposes. *Journal of Orthopaedic Research*, 29, 853-860. doi:10.1002/jor.21314

K

- Kang, S. K., Putnam, L. A., Ylostalo, J., Popescu, I. R., Dufour, J., Belousov, A., y Bunnell, B. A. (2004). Neurogenesis of Rhesus adipose stromal cells. *Journal of Cell Science*, 117(18), 4289-4299. doi:10.1242/jcs.01264
- Kapur, S. K., y Katz, A. J. (2013). Review of the adipose derived stem cell secretome. *Biochimie*, 95(12), 2222-2228. doi:10.1016/j.biochi.2013.06.001
- Karageorgiou, V., Tomkins, M., Fajardo, R., Meinel, L., Snyder, B., Wade, K., [...] y Kaplan, D. L. (2006). Porous silk fibroin 3-D scaffolds for delivery of bone morphogenetic protein-2 in vitro and in vivo. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A*, 78(2), 324-334. doi:10.1002/jbm.a.30728
- Keung, E. Z., Nelson, P. J., y Conrad, C. (2013). Concise review: genetically engineered stem cell therapy targeting angiogenesis and tumor stroma in gastrointestinal malignancy. *Stem Cells*, 31(2), 227-235. doi:10.1002/stem.1269
- Kim, H. P., Ji, Y. H., Rhee, S. C., Dhong, E. S., Park, S. H., y Yoon, E. S. (2012). Enhancement of bone regeneration using osteogenic-induced adipose-derived stem cells combined with demineralizing bone matrix in a rat critically-sized calvarial defect model. *Current Stem Cell Research & Therapy*, 7(3), 165-172. doi:10.2174/157488812799859847
- Kim, J. Y., Jin, G. Z., Park, I. S., Kim, J. N., Chun, S. Y., Park, E. K., [...] y Cho, D. W. (2010). Evaluation of solid free-form fabrication-based scaffolds seeded with osteoblasts and human umbilical vein endothelial cells for use in vivo osteogenesis. *Tissue Engineering. Part A*, 16(7), 2229-2236. doi: 10.1089/ten.TEA.2009.0644
- Kingham, P. J., Kalbermatten, D. F., Mahay, D., Armstrong, S. J., Wiberg, M., y Terenghi, G. (2007). Adipose-derived stem cells differentiate into a Schwann cell phenotype and promote neurite outgrowth in vitro. *Experimental Neurology*, 207(2), 267-274. doi:10.1016/j.expneurol.2007.06.029
- Kitoh, H., Kitakoji, T., Tsuchiya, H., Mitsuyama, H., Nakamura, H., Katoh, M., e Ishiguro, N. (2004). Transplantation of marrow-derived mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma during distraction osteogenesis – a preliminary result of three cases. *Bone*, 35(4), 892-898. doi:10.1016/j.bone.2004.06.013

Kübler, N., Michel, C., Zöller, J., Bill, J., Mühling, J., y Reuther, J. (1995). Repair of human skull defects using osteoinductive bone alloimplants. *Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery*, 23(6), 337-346.

L

Le Blanc, K., Tammik, C., Rosendahl, K., Zetterberg, E., Ringdén, O. (2003). HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. *Experimental Hematology*, 31(10), 890-896. doi:10.1016/S0301-472X(03)00110-3

Lee, K. D., Kuo, T. K., Whang-Peng, J., Chung, Y. F., Lin, C. T., Chou, S. H., [...] y Lee, O. K. (2004). In vitro hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Hepatology*, 40(6), 1275-1284. doi:10.1002/hep.20469

LeGeros, R. Z. (2002). Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 395(395), 81-98. doi:10.1097/00003086-200202000-00009

Lendeckel, S., Jödicke, A., Christophis, P., Heidinger, K., Wolff, J., Fraser, J. K., [...] y Howaldt, H. P. (2004). Autologous stem cells (adipose) and fibrin glue used to treat widespread traumatic calvarial defects: case report. *Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery*, 32(6), 370-373. doi:10.1016/j.jcms.2004.06.002

Leong, K. F., Cheah, C. M., y Chua, C. K. (2003). Solid freeform fabrication of three-dimensional scaffolds for engineering replacement tissues and organs. *Biomaterials*, 24(13), 2363-2378. doi:10.1016/S0142-9612(03)00030-9

Levi, B., James, A. W., Nelson, E. R., Vistnes, D., Wu, B., Lee, M., [...] y Longaker, M. T. (2010). Human adipose derived stromal cells heal critical size mouse calvarial defects. *PLoS One*, 5(6), e11177. doi:10.1371/journal.pone.0011177

Li, X. M., Feng, Q. L., y Cui, F. Z. (2006). In vitro degradation of porous nano-hydroxyapatite/collagen/PLLA scaffold reinforced by chitin fibres. *Materials Science and Engineering. C: Materials for Biological Applications*, 26, 716-720. doi:10.1016/j.msec.2005.06.062

Liao, H.-T., y Chen, C. T. (2014). Osteogenic potential: comparison between bone marrow and adipose-derived mesenchymal stem cells. *World Journal of Stem Cells*, 6(3), 288-295. doi:10.4252/wjsc.v6.i3.288

- Liao, S. S., y Cui, F. Z. (2004). In vitro and in vivo degradation of mineralized collagen-based composite scaffold: nanohydroxyapatite/collagen/poly(L-lactide). *Tissue Engineering*, 10(1-2), 73-80. doi:10.1089/107632704322791718
- Liao, S. S., Cui, F. Z., y Zhu, Y. (2004). Osteoblasts adherence and migration through three dimensional porous mineralized collagen based composite: nHAC/PLA. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 19, 117-130.
- Lichte, P., Pape, H. C., Pufe, T., Kobbe, P., y Fischer, H. (2011). Scaffolds for bone healing: concepts, materials and evidence. *Injury*, 42(6), 569-573. doi:10.1016/j.injury.2011.03.033
- Lin, Y., Wang, T., Wu, L., Jing, W., Chen, X., Li, Z., [...] y Tian, W. (2007). Ectopic and in situ bone formation of adipose tissue-derived stromal cells in biphasic calcium phosphate nanocomposite. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A*, 81(4), 900-910. doi:10.1002/jbm.a.31149
- Lindroos, B., Suuronen, R., y Miettinen, S. (2011). The potential of adipose stem cells in regenerative medicine. *Stem Cell Reviews and Reports*, 7(2), 269-291. doi:10.1007/s12015-010-9193-7
- Liu, G., Zhang, Y., Liu, B., Sun, J., Li, W., y Cui, L. (2013). Bone regeneration in a canine cranial model using allogeneic adipose derived stem cells and coral scaffold. *Biomaterials*, 34(11), 2655-2664. doi:10.1016/j.biomaterials.2013.01.004
- Locke, M., Windsor, J., y Dunbar, P. R. (2009). Human adipose-derived stem cells: isolation, characterization and applications in surgery. *ANZ Journal of Surgery*, 79(4), 235-244. doi:10.1111/j.1445-2197.2009.04852.x
- Longo, U. G., Loppini, M., Berton, A., La Verde, L., Khan, W. S., y Denaro, V. (2012). Stem cells from umbilical cord and placenta for musculoskeletal tissue engineering. *Current Stem Cell Research & Therapy*, 7(4), 272-281.

M

- Majumdar, M. K., Keane-Moore, M., Buyaner, D., Hardy, W. B., Moorman, M. A., McIntosh, K. R., Mosca, J. D. (2003). Characterization and functionality of cell surface molecules on human mesenchymal stem cells. *Journal of Biomedical Science*, 10(2), 228-241. doi:68710

- Matsumoto, D., Sato, K., Gonda, K., Takaki, Y., Shigeura, T., Sato, T., [...] y Yoshimura, K. (2006). Cell-assisted lipotransfer: supportive use of human adipose-derived cells for soft tissue augmentation with lipoinjection. *Tissue Engineering*, 12(12), 3375-3382. doi: 10.1089/ten.2006.12.3375
- Meana, A., García, E., García, V., Jorcano, J. L., Del Río, M., Larcher, F., Duarte, B., y Holguin, A. (2008). Procedimiento de obtención de estructuras tridimensionales para ingeniería tisular. España, patente WO2008/119855. [Solicitante: Centro Comunitario de Sangre y Tejidos de Asturias, y Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas.]
- Meinel, L., Karageorgiou, V., Fajardo, R., Snyder, B., Shinde-Patil, V., Zichner, L., [...] y Vunjak-Novakovic, G. (2004). Bone tissue engineering using human mesenchymal stem cells: effects of scaffold material and medium flow. *Annals of Biomedical Engineering*, 32(1), 112-122.
- Mesimäki, K., Lindroos, B., Törnwall, J., Mauno, J., Lindqvist, C., Kontio, R., [...] y Suuronen, R. (2009). Novel maxillary reconstruction with ectopic bone formation by GMP adipose stem cells. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 38(3), 201-209. doi:10.1016/j.ijom.2009.01.001
- Mizuno, H. (2009). Adipose-derived stem cells for tissue repair and regeneration: ten years of research and a literature review. *Journal of Nippon Medical School*, 76(2), 56-66.
- Mohan, B. G., Suresh Babu, S., Varma, H. K., y John, A. (2013). *In vitro* evaluation of bioactive strontium-based ceramic with rabbit adipose-derived stem cells for bone tissue regeneration. *Journal of Material Science: Materials in Medicine*, 24(12), 2831-2844. doi:10.1007/s10856-013-5018-y
- Moriscot, C., de Fraipont, F., Richard, M. J., Marchand, M., Savatier, P., Bosco, D., [...] y Benhamou, P. Y. (2005). Human bone marrow mesenchymal stem cells can express insulin and key transcription factors of the endocrine pancreas developmental pathway upon genetic and/or microenvironmental manipulation in vitro. *Stem Cells*, 23(4), 594-603. doi:10.1634/stemcells.2004-0123
- Moroni, L., y Fornasari, P. M. (2013). Human mesenchymal stem cells: a bank perspective on the isolation, characterization and potential of alternative sources for the regeneration of musculoskeletal tissues. *Journal of Cellular Physiology*, 228(4), 680-687. doi:10.1002/jcp.24223

Murphy, C. M., y O'Brien, F. J. (2010). Understanding the effect of mean pore size on cell activity in collagen-glycosaminoglycan scaffolds. *Cell Adhesion & Migration*, 4(3), 377-381. doi:10.4161/cam.4.3.11747

Mygind, T., Stiehler, M., Baatrup, A., Li, H., Zou, X., Flyvbjerg, A., [...] y Bünger, C. (2007). Mesenchymal stem cell ingrowth and differentiation on coralline hydroxyapatite scaffolds. *Biomaterials*, 28(6), 1036-1047. doi:10.1016/j.biomaterials.2006.10.003

N

Nguyen, K. T., y West, J. L. (2002). Photopolymerizable hydrogels for tissue engineering applications. *Biomaterials*, 23(22), 4307-4314. doi:10.1016/S0142-9612(02)00175-8

Noël, D., Caton, D., Roche, S., Bony, C., Lehmann, S., Casteilla, L., [...] y Cousin, B. (2008). Cell specific differences between human adipose-derived and mesenchymal-stromal cells despite similar differentiation potentials. *Experimental Cell Research*, 314(7), 1575-1584. doi:10.1016/j.yexcr.2007.12.022

P

Padoin, A. V., Braga-Silva, J., Martins, P., Rezende, K., Rezende, A. R., Grechi, B., [...] y Machado, D. C. (2008). Sources of processed lipoaspirate cells: influence of donor site on cell concentration. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 122(2), 614-618. doi:10.1097/PRS.0b013e31817d5476

Parfitt, A. M., Drezner, M. K., Glorieux, F. H., Kanis, J. A., Malluche, H., [...] y Recker, R. R. (1987). Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *Journal of Bone and Mineral Research*, 2(6), 595-610. doi:10.1002/jbmr.5650020617

Parrilla, C., Saulnier, N., Bernardini, C., Patti, R., Tartaglione, T., Fetoni, A. R., [...] y Lattanzi, W. (2011). Undifferentiated human adipose tissue-derived stromal cells induce mandibular bone healing in rats. *Archives of Otolaryngology – Head & Neck Surgery*, 137(5), 463-470. doi:10.1001/archoto.2011.61

Peptan, I. A., Hong, L., y Mao, J. J. (2006). Comparison of osteogenic potentials of visceral and subcutaneous adipose-derived cells of rabbits. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 117(5), 1462-1470. doi:10.1097/01.prs.0000206319.80719.74

Pittenger, M. F., Mackay, A. M., Beck, S. C., Jaiswal, R. K., Douglas R., Mosca, J. D., [...] y Marshak, D. R. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 284(5411), 143-147.

Planat-Benard, V., Silvestre, J. S., Cousin, B., André, M., Nibbelink, M., Tamarat, R., [...] y Casteilla, L. (2004). Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives. *Circulation*, 109(5), 656-663. doi:10.1161/01.CIR.0000114522.38265.61

Polo-Corrales, L., Latorre-Esteves, M., y Ramirez-Vick, J. E. (2014). Scaffold design for bone regeneration. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 14(1), 15-56. doi:10.1166/jnn.2014.9127

Prockop, D. J. (1997). Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science*, 276(5309), 71-74.

Puglisi, M. A., Tesori, V., Lattanzi, W., Piscaglia, A. C., Gasbarrini, G. B., D'Ugo, D. M., y Gasbarrini, A. (2011). Therapeutic implications of mesenchymal stem cells in liver injury. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 860578. doi: 10.1155/2011/860578

Q

Qu, C. Q., Zhang, G. H., Zhang, L. J., y Yang, G. S. (2007). Osteogenic and adipogenic potential of porcine adipose mesenchymal stem cells. *In Vitro Cellular and Developmental Biology. Animal*, 43(2), 95-100. doi:10.1007/s11626-006-9008-y

Quarto, R., Mastrogiacomo, M., Cancedda, R., Kutepov, S. M., Mukhachev, V., Lavroukov, A., [...] y Marcacci, M. (2001). Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells. *The New England Journal of Medicine*, 344(5), 385-386. doi:10.1056/NEJM200102013440516

R

Rada, T., Reis, R. L., y Gomes, M. E. (2009). Adipose tissue-derived stem cells and their application in bone and cartilage tissue engineering. *Tissue Engineering. Part B: Reviews*, 15(2), 113-125. doi:10.1089/ten.teb.2008.0423

Rada, T., Santos, T. C., Marques, A. P., Correlo, V. M., Frias, A. M., Castro, A. G., [...] y Reis, R. L. (2012). Osteogenic differentiation of two distinct subpopulations of human

adipose-derived stem cells: an *in vitro* and *in vivo* study. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 6(1), 1-11. doi:10.1002/term.388

Robey, P. G. (2011). Cell sources for bone regeneration: the good, the bad, and the ugly (but promising). *Tissue Engineering. Part B: Reviews*, 17(6), 423-430. doi:10.1089/ten.teb.2011.0199

Rigotti, G., Marchi, A., Galiè, M., Baroni, G., Benati, D., Krampera, M., [...] y Sbarbati, A. (2007). Clinical treatment of radiotherapy tissue damage by lipoaspirate transplant: a healing process mediated by adipose-derived adult stem cells. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 119(5), 1409-1424. doi:10.1097/01.prs.0000256047.47909.71

Romagnoli, C., y Brandi, M. L. (2014). Adipose mesenchymal stem cells in the field of bone tissue engineering. *World Journal of Stem Cells*, 6(2), 144-152. doi:10.4252/wjsc.v6.i2.144

Rouwkema, J., Rivron, N. C., y van Blitterswijk, C. A. (2008). Vascularization in tissue engineering. *Trends in Biotechnology*, 26(8), 434-441. doi:10.1016/j.tibtech.2008.04.009

Ruetze, M., y Richter, W. (2014). Adipose-derived stromal cells for osteoarticular repair: trophic function versus stem cell activity. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 16, e9. doi:10.1017/erm.2014.9

S

Saadeh, P. B., Khosla, R. K., Mehrara, B. J., Steinbrech, D. S., McCormick, S. A., DeVore, D. P., y Longaker, M. T. (2001). Repair of a critical size defect in the rat mandible using allogenic type I collagen. *The Journal of Craniofacial Surgery*, 12(6), 573-579.

Safford, K. M., Hicok, K. C., Safford, S. D., Halvorsen, Y. D., Wilkison, W. O., Gimble, J. M., y Rice, H. E. (2002). Neurogenic differentiation of murine and human adipose-derived stromal cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 294(2), 371-379. doi:10.1016/S0006-291X(02)00469-2

Sagnella, S., y Mai-Ngam, K. (2005). Chitosan based surfactant polymers designed to improve blood compatibility on biomaterials. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, 42(2), 147-155. doi:10.1016/j.colsurfb.2004.07.001

- Sandonis Oleaga, I. (2015). *Andamios porosos*, tesis doctoral dirigida por la doctora Esperanza Díaz Tajada, Universidad del País Vasco. [En línea: <<https://addi.ehu.es/handle/10810/18312>>; consulta: 16-03-2017.]
- Sándor, G. K. (2012). Tissue engineering of bone: clinical observations with adipose-derived stem cells, resorbable scaffolds, and growth factors. *Annals of Maxillofacial Surgery*, 2(1), 8-11. doi:10.4103/2231-0746.95308
- Schäffler, A., y Büchler, C. (2007). Concise review: adipose tissue-derived stromal cells – basic and clinical implications for novel cell-based therapies. *Stem Cells*, 25(4), 818-827. doi:10.1634/stemcells.2006-0589
- Scherberich, A., Müller, A. M., Schäfer D. J., Banfi, A., y Martin, I. (2010). Adipose tissue-derived progenitors for engineering osteogenic and vasculogenic grafts. *Journal of Cellular Physiology*, 225(2), 348-353. doi:10.1002/jcp.22313
- Schmidt-Rohlfing, B., Tzioupis, C., Menzel, C. L., y Pape, H. C. (2009). Tissue engineering of bone tissue. Principles and clinical applications.] *Der Unfallchirurg*, 112(9), 785-794; quiz 795. doi:10.1007/s00113-009-1695-x
- Schreml, S., Babilas, P., Fruth, S., Orsó, E., Schmitz, G., Mueller, M. B., [...] y Prantl, L. (2009). Harvesting human adipose tissue-derived adult stem cells: resection versus liposuction. *Cytotherapy*, 11(7), 947-957. doi:10.3109/14653240903204322
- Sen, A., Lea-Currie, Y. R., Sujkowska, D., Franklin, D. M., Wilkison, W. O., Halvorsen, Y. D., y Gimble, J. M. (2001). Adipogenic potential of human adipose derived stromal cells from multiple donors is heterogeneous. *Journal of Cellular Biochemistry*, 81(2), 312-319.
- Seo, M. J., Suh, S. Y., Bae, Y. C., y Jung, J. S. (2005). Differentiation of human adipose stromal cells into hepatic lineage *in vitro* and *in vivo*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 328(1), 258-264. doi:10.1016/j.bbrc.2004.12.158
- Stockmann, P., Park, J., von Wilmowsky, C., Nkenke, E., Felszeghy, E., Dehner, J. F., [...] y Schlegel, K. A. (2012). Guided bone regeneration in pig calvarial bone defects using autologous mesenchymal stem/progenitor cells – a comparison of different tissue sources. *Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery*, 40(4), 310-320. doi: 10.1016/j.jcms.2011.05.004
- Streckbein, P., Jäckel, S., Malik, C. Y., Obert, M., Kähling, C., Wilbrand, J. F., [...] y Howaldt, H. P. (2013). Reconstruction of critical-size mandibular defects in

immunoincompetent rats with human adipose-derived stromal cells. *Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery*, 41(6), 496-503. doi:10.1016/j.jcms.2013.04.002

Sunay, O., Can, G., Cakir, Z., Denek, Z., Kozanoglu, I., Erbil, G., [...] y Baran, Y. (2013). Autologous rabbit adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells for the treatment of bone injuries with distraction osteogenesis. *Cytotherapy*, 15(6), 690-702. doi:10.1016/j.jcyt.2013.02.004

T

Tholpady, S. S., Katz, A. J., y Ogle, R. C. (2003). Mesenchymal stem cells from rat visceral fat exhibit multipotential differentiation in vitro. *The Anatomical Record. Part A: Discoveries in Molecular, Cellular and Evolutionary Biology*, 272(1), 398-402. doi:10.1002/ar.a.10039

Timper, K., Seboek, D., Eberhardt, M., Linscheid, P., Christ-Crain, M., Keller, U., [...] y Zulewski, H. (2006). Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells differentiate into insulin, somatostatin, and glucagon expressing cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 341(4), 1135-1140. doi:10.1016/j.bbrc.2006.01.072

Tobita, M., Uysal, A. C., Ogawa, R., Hyakusoku, H., Mizuno, H. (2008). Periodontal tissue regeneration with adipose-derived stem cells. *Tissue Engineering. Part A*, 14(6), 945-953. doi:10.1089/ten.tea.2007.0048

Torres, F. C., Rodrigues, C. J., Stocchero, I. N., y Ferreira, M. C. (2007). Stem cells from the fat tissue of rabbits: an easy-to-find experimental source. *Aesthetic Plastic Surgery*, 31(5), 574-578. doi:10.1007/s00266-007-0001-y

Trottier, V., Marceau-Fortier, G., Germain, L., Vincent, C., y Fradette, J. (2008). IFATS collection: Using human adipose-derived stem/stromal cells for the production of new skin substitutes. *Stem Cells*, 26(10), 2713-2723. doi:10.1634/stemcells.2008-0031

Tsuji, W., Rubin, J. P., y Marra, K. G. (2014). Adipose-derived stem cells: Implications in tissue regeneration. *World Journal of Stem Cells*, 6(3), 312-321. doi:10.4252/wjsc.v6.i3.312

Tuzlakoglu, K., y Reis, R. L. (2007). Formation of bone-like apatite layer on chitosan fiber mesh scaffolds by a biomimetic spraying process. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 18(7), 1279-1286. doi:10.1007/s10856-006-0063-4

V

- Valcz, G., Krenács, T., Sipos, F., Leiszter, K., Tóth, K., Balogh, Z., [...] y Tulassay, Z. (2011). The role of the bone marrow derived mesenchymal stem cells in colonic epithelial regeneration. *Pathology Oncology Research*, 17(1), 11-16. doi:10.1007/s12253-010-9262-x.
- Van Harmelen, V., Skurk, T., Röhrig, K., Lee, Y. M., Halbleib, M., Aprath-Husmann, I., y Hauner, H. (2003). Effect of BMI and age on adipose tissue cellularity and differentiation capacity in women. *International Journal of Obesity*, 27, 889-895. doi:10.1038/sj.ijo.0802314
- Vidal, M. A., Kilroy, G. E., Lopez, M. J., Johnson, J. R., Moore, R. M., y Gimble, J. M. (2007). Characterization of equine adipose tissue-derived stromal cells: adipogenic and osteogenic capacity and comparison with bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *Veterinary Surgery*, 36(7), 613-622. doi:10.1111/j.1532-950X.2007.00313.x
- Vo, T. N., Kasper, F. K., y Mikos, A. G. (2012). Strategies for controlled delivery of growth factors and cells for bone regeneration. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64(12), 1292-1309. doi:10.1016/j.addr.2012.01.016
- Vunjak-Novakovic, G., Meinel, L., Altman, G., y Kaplan, D. (2005). Bioreactor cultivation of osteochondral grafts. *Orthodontics and Craniofacial Research*, 8(3), 209-218. doi:10.1111/j.1601-6343.2005.00334.x

W

- Wahl, D. A., y Czernuszka, J. T. (2006). Collagen-hydroxyapatite composites for hard tissue repair. *European Cells and Materials*, 11, 43-56.
- Wakitani, S., Saito, T., y Caplan, A. I. (1995). Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine. *Muscle & Nerve*, 18(12), 1417-1426. doi:10.1002/mus.880181212
- Wang, C. Z., Chen, S. M., Chen, C. H., Wang, C. K., Wang, G. J., Chang, J. K., y Ho, M. L. (2010). The effect of the local delivery of alendronate on human adipose-derived stem cell-based bone regeneration. *Biomaterials*, 31(33), 8674-8683. doi:10.1016/j.biomaterials.2010.07.096

- Waselau, M., Patrikoski, M., Juntunen, M., Kujala, K., Kääriäinen, M., Kuokkanen, H., [...] y Miettinen, S. (2012). Effects of bioactive glass S53P4 or beta-tricalcium phosphate and bone morphogenetic protein-2 and bone morphogenetic protein-7 on osteogenic differentiation of human adipose stem cells. *Journal of Tissue Engineering*, 3(1), 2041731412467789. doi:10.1177/2041731412467789
- Whang, K., Healy, K. E., Elenz, D. R., Nam, E. K., Tsai, D. C., Thomas, C. H., [...] y Sprague, S. M. (1999). Engineering bone regeneration with bioabsorbable scaffolds with novel microarchitecture. *Tissue Engineering*, 5(1), 35-51. doi:10.1089/ten.1999.5.35
- Willerth, S. M., y Sakiyama-Elbert, S. E. (2008). Combining stem cells and biomaterial scaffolds for constructing tissues and cell delivery. En Girard, L. (ed.), *StemBook*, Cambridge (Massachusetts): Harvard Stem Cell Institute, en línea: <<http://www.stembook.org/node/450.html>>; consulta: 15-02-2017. doi:10.3824/stembook.1.1.1
- Wilson, A., Butler, P. E., y Seifalian, A. M. (2011). Adipose-derived stem cells for clinical applications: a review. *Cell Proliferation*, 44(1), 86-98. doi:10.1111/j.1365-2184.2010.00736.x
- Wilson, S. M., Goldwasser, M. S., Clark, S. G., Monaco, E., Bionaz, M., Hurley, W. L., [...] y Wheeler, M. B. (2012). Adipose-derived mesenchymal stem cells enhance healing of mandibular defects in the ramus of swine. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 70(3), e193-203. doi:10.1016/j.joms.2011.10.029
- Woodard, J. R., Hilldore, A. J., Lan, S. K., Park, C. J., Morgan, A. W., Eurell, J. A., [...] y Wagoner Johnson, A. J. (2007). The mechanical properties and osteoconductivity of hydroxyapatite bone scaffolds with multi-scale porosity. *Biomaterials*, 28(1), 45-54. doi:10.1016/j.biomaterials.2006.08.021
- Woodbury, D., Schwarz, E. J., Prockop, D. J., y Black, I. B. (2000). Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *Journal of Neuroscience Research*, 61(4), 364-370. doi:10.1002/1097-4547(20000815)61:4<364::AID-JNR2>3.0.CO;2-C

- Yabana, T., Arimura, Y., Tanaka, H., Goto, A., Hosokawa, M., Nagaishi, K., [...] y Shinomura, Y. (2009). Enhancing epithelial engraftment of rat mesenchymal stem cells restores epithelial barrier integrity. *Journal of Pathology*, 218(3), 350-359. doi:10.1002/path.2535
- Yang, S., Huang, S., Feng, C., y Fu, X. (2012). Umbilical cord-derived mesenchymal stem cells: strategies, challenges, and potential for cutaneous regeneration. *Frontiers of Medicine*, 6(1), 41-47. doi:10.1007/s11684-012-0175-9
- Yoon, E., Dhar, S., Chun, D. E., Gharibjanian, N. A., y Evans, G. R. (2007). In vivo osteogenic potential of human adipose-derived stem cells/poly lactide-co-glycolic acid constructs for bone regeneration in a rat critical-sized calvarial defect model. *Tissue Engineering*, 13(3), 619-627. doi:10.1089/ten.2006.0102
- Yoon, S. J., Park, K. S., Kim, M. S., Rhee, J. M., Khang, G., y Lee, H. B. (2007). Repair of diaphyseal bone defects with calcitriol-loaded PLGA scaffolds and marrow stromal cells. *Tissue Engineering*, 13(5), 1125-1133. doi:10.1089/ten.2006.0287
- Yoshimura, H., Muneta, T., Nimura, A., Yokoyama, A., Koga, H., y Sekiya, I. (2006). Comparison of rat mesenchymal stem cells derived from bone marrow, synovium, periosteum, adipose tissue, and muscle. *Cell and Tissue Research*, 327(3), 449-462. doi:10.1007/s00441-006-0308-z
- Yoshimura, K., Sato, K., Aoi, N., Kurita, M., Hirohi, T., y Harii, K. (2008a). Cell-assisted lipotransfer for cosmetic breast augmentation: supportive use of adipose-derived stem/stromal cells. *Aesthetic Plastic Surgery*, 32(1), 48-55; comentario, 56-57. doi:10.1007/s00266-007-9019-4
- Yoshimura, K., Sato, K., Aoi, N., Kurita, M., Inoue, K., Suga, H., [...] y Harii, K. (2008b). Cell-assisted lipotransfer for facial lipoatrophy: efficacy of clinical use of adipose-derived stem cells. *Dermatologic Surgery*, 34(9), 1178-1185. doi:10.1111/j.1524-4725.2008.34256.x
- Yoshimura, K., Shigeura, T., Matsumoto, D., Sato, T., Takaki, Y., Aiba-Kojima, E., [...] y Gonda, K. (2006). Characterization of freshly isolated and cultured cells derived from the fatty and fluid portions of liposuction aspirates. *Journal of Cellular Physiology*, 208(1), 64-76. doi:10.1002/jcp.20636

- Young, R. G., Butler, D. L., Weber, W., Caplan, A. I., Gordon, S. L., y Fink, D. J. (1998). Use of mesenchymal stem cells in a collagen matrix for Achilles tendon repair. *Journal of Orthopaedic Research*, 16(4), 406-413. doi:10.1002/jor.1100160403
- Yuan, X., Mak, A. F., y Li, J. (2001). Formation of bone-like apatite on poly (L-lactic acid) fibers by a biomimetic process. *Journal of Biomedical Materials Research*, 57(1), 140-150. PMID: 11616861.

Z

- Zhang, P., Wu, H., Wu, H., Lù, Z., Deng, C., Hong, Z., [...] y Chen, X. (2011). RGD-conjugated copolymer incorporated into composite of poly(lactide-co-glycotide) and poly(L-lactide)-grafted nanohydroxyapatite for bone tissue engineering. *Biomacromolecules*, 12(7), 2667-2680. doi:10.1021/bm2004725
- Zhu, M., Heydarkhan-Hagvall, S., Hedrick, M., Benhaim, P., y Zuk, P. (2013). Manual isolation of adipose-derived stem cells from human lipoaspirates. *Journal of Visualized Experiments*, 79, e50585. doi:10.3791/50585
- Zuk, P. (2013). Adipose-derived stem cells in tissue regeneration: a review. *ISRN Stem Cells*, 2013(1), 1-35. doi:10.1155/2013/713959
- Zuk, P. A., Zhu, M., Ashjian, P., De Ugarte, D. A., Huang, J. I., Mizuno, H., [...] y Hedrick, M. H. (2002). Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Molecular Biology of the Cell*, 13(12), 4279-4295. doi:10.1091/mbc.E02-02-0105
- Zuk, P. A., Zhu, M., Mizuno, H., Huang, J., Futrell, J. W., Katz, A. J., [...] y Hedrick, M. H. (2001). Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Engineering*, 7(2), 211-228. doi:10.1089/107632701300062859