

Regeneración ósea por medio de células madre en combinación con beta-fosfato tricálcico

Bone regeneration using stem cells in combination with beta-tricalcium phosphate carrier

Blanco Antona L, García Cenador MB, Sánchez Ledesma MJ, Rojo López R, Muntión Olave S, Collía Fernández F, De Vicente Jiménez J, López-Valverde Centeno A

Departamento de Cirugía. Facultad de Medicina. Universidad de Salamanca. Departamento de Estomatología de la Universidad Rey Juan Carlos, Madrid, España. Terapia Celular y Medicina Regenerativa. Servicio de Hematología. Hospital Universitario de Salamanca. IBSAL. Departamento de Anatomía e Histología Humanas. Facultad de Medicina. Universidad de Salamanca, Salamanca, España.

Esta investigación ha sido financiada por FUNDACIÓN MAPFRE

Resumen

Objetivo: Estudiar si las células madre adultas mesenquimales en combinación con beta-fosfato tricálcico contribuyen significativamente a la regeneración en una lesión ósea traumatizada.

Material y método: Se utilizó un modelo de defecto traumático en el fémur de ratas Wistar (n=39). Fueron diseñados dos grupos: el grupo 1 (control), con nueve ratas a las que se les realizó un defecto óseo vacío; y el grupo 2 (experimental), con tres subgrupos de 10 ratas cada uno, a las que se les administró beta-fosfato tricálcico (β -TCP) y β -TCP en combinación con células madre mesenquimales (MSC). Se valoraron resultados a las tres, seis y nueve semanas de evolución, respectivamente.

Resultados: Se observó el 65% de las fracturas en los fémures derechos de las ratas, que en grupo experimental corresponde a la zona donde se implanta el *carrie* en combinación con las MSC, aunque sólo el 35% de estas coinciden exactamente con esta zona. No existen diferencias de comportamiento biológico significativas, aunque se demuestra actividad osteogénica.

Conclusión: El uso de β -TCP en combinación con células estromales mesenquimales no genera resultados significativos en la regeneración ósea. Todavía es necesario potenciar la investigación en fase experimental.

Palabras clave:

Células madre mesenquimales, MSC, regeneración ósea, beta-fosfato tricálcico.

Abstract

Objective: To study whether adult mesenchymal stem cells in combination with a carrier of beta-tricalcium phosphate contributes significantly in regenerating bone injury in traumatized.

Material and method: A traumatic defect model on the femur was used in Wistar rats (n=38). Two groups were designed: the group 1 (control) with 9 rats to which they there was realized a bone defect empty fault, and the group 2 (experimental), with three subgroups (2a, 2b, 2c) of 10 rat each, which were administered the carrier beta-tricalcium phosphate (β -TCP), and β -TCP in combination with mesenchymal stem cells (MSC). Results were valued to 3, 6 and 9 weeks of evolution, respectively.

Results: There were 65% of the fractures in the right femur of rats in the experimental group that corresponds to the area where the carrier is implanted in combination with the MSC, but only 35% of these coincide exactly with this area. No significant differences in biological behavior, although it shows osteogenic activity.

Conclusion: The use of β -TCP carrier in combination with mesenchymal stromal cells does not produce significant results in bone regeneration. There is a need for further research in experimental phase.

Key words:

Mesenchymal stem cells, MSC, bone regeneration, beta-tricalcium phosphate carrier.

Correspondencia

A López-Valverde Centeno
Clínica Odontológica. Facultad Medicina. Universidad de Salamanca.
Alfonso X el Sabio s/n. Campus Unamuno. 37007 Salamanca, España.
E-mail: anlopezvalverde@gmail.com

Introducción

Las carencias de tejido óseo en el organismo que requieren del uso de injertos normalmente son consecuencia de defectos postraumáticos [1], secuelas derivadas de cirugía oncológica [2] o patología degenerativa como la osteoporosis [3]. Los procedimientos clínicos disponibles tienen un uso limitado debido a la morbilidad del lugar donante, en el caso de los autoinjertos, o bien, por el rechazo autoinmune o la baja capacidad regenerativa, en el caso de los aloinjertos o xenoinjertos. Todas estas limitaciones han dado lugar a la búsqueda de nuevas formas de restituir los procesos biológicos que han resultado dañados, bien mediante el aporte de precursores celulares sanos, en procesos conocidos como terapias celulares, o bien mediante la aplicación de factores de crecimiento producidos normalmente por células [4].

La medicina regenerativa sustituye o regenera células humanas, tejidos u órganos con la finalidad de restaurar o establecer una función normal [5]. El uso de células madre (*Stem Cells*, SCs) representa una opción prometedora para resolver muchos de los defectos orgánicos mencionados anteriormente, asegurando un número suficiente de células específicas en el tejido y eliminando los problemas de rechazo inmunológico y morbilidad [6]. En los últimos años ha habido un creciente interés por las células estromales mesenquimales (*Mesenchymal Stromal Cells*, MSC) por ser las primeras células no hematopoyéticas aisladas de la médula ósea y más ampliamente caracterizadas [7]. Tienen capacidad de auto-renovación, proliferación y capacidad para diferenciarse de distintos linajes de tejido mesodérmico, que incluye el hueso, el cartílago, la grasa, los tendones, el músculo y el estroma medular [8].

El propósito del presente trabajo es estudiar la capacidad de las células estromales mesenquimales en combinación con beta-fosfato tricálcico (β -TCP) para transformarse *in vivo*

en células osteoblásticas y permitir la regeneración en un modelo de lesión traumática en el fémur de ratas.

Material y métodos

Se utilizaron 39 ratas Wistar macho, con un peso de entre 300 y 350 g. Se diseñaron dos grupos experimentales: el grupo 1 (control) y el grupo 2 (experimental) (Tabla 1). En el grupo 1 control se realizó un defecto óseo en el fémur inferior derecho de nueve ratas. Se dejó evolucionar libremente la regeneración del tejido óseo para proceder a su estudio a las tres, seis y nueve semanas, con cada tres especímenes, respectivamente. En el grupo 2 experimental se realizaron en el fémur derecho dos defectos óseos: en uno se implantó beta-fosfato tricálcico (KeraOs®) en combinación con MSC y el otro se dejó evolucionar libremente como control. En el fémur izquierdo se realizó un defecto óseo en el que sólo se implantó beta-fosfato tricálcico (KeraOs®). Para el grupo 2 se establecieron tres subgrupos (2a,2b,2c) de 10 animales cada uno, con tiempos de estudio a las tres, seis y nueve semanas.

A lo largo del presente estudio, todos los animales fueron manejados siguiendo la normativa legal española acerca de la utilización de animales de laboratorio y los principios para el cuidado y manejo de animales establecidos por la Sociedad Americana de Investigación Médica.

Las células estromales mesenquimales (MSC) se obtuvieron a partir de células mononucleadas de la médula ósea de donantes voluntarios sanos. La extracción de médula ósea se realizó bajo anestesia locoregional por punción de la espina iliaca postero-superior. Posteriormente, las muestras se procesaron en el Laboratorio de Terapia Celular del Hospital Universitario de Salamanca hasta la obtención de un número adecuado para su utilización. Para la caracterización de las células estromales mesenquimales se siguieron los criterios mínimos propuestos por la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT) [9].

Tabla 1. Diseño de los grupos del experimento

Tiempo de evolución (semanas)	Grupo 1. Control		Grupo 2. Experimental	
	Fémur		Fémur	
	Derecho	Izquierdo	Derecho	Izquierdo
3	Defecto vacío	Defecto vacío	MSC+ β -TCP / Defecto vacío	β -TCP
6	Defecto vacío	Defecto vacío	MSC+ β -TCP / Defecto vacío	β -TCP
9	Defecto vacío	Defecto vacío	MSC+ β -TCP / Defecto vacío	β -TCP

La caracterización inmunofenotípica se realizó en CSM en pase empleando el siguiente panel de anticuerpos monoclonales y en las siguientes combinaciones cuádruples de colores (FITC/PE/PerCPCy5.5/APC) mediante la técnica de inmunofluorescencia directa. Tubo 1: CD90/CD106/CD45; Tubo 2: CD34/CD166/anti-HLA-DR/CD105; Tubo 3: CD14/CD73/CD19. En todos los casos se utilizaron como control células de la misma muestra sin marcar con anticuerpos. En cuanto a la diferenciación osteogénica, se plantaron dos muestras en paralelo, una para la diferenciación hacia osteoblastos y otra se utilizó como control negativo manteniéndose en las mismas condiciones (37° C, 5%CO₂, humedad>90%). Estos cultivos se mantuvieron durante 10 días con medio de diferenciación osteogénica (NH Osteodiff Médium, Miltenyi, Bistec, Germany). El recambio del medio se realizó cada 3-4 días. Para comprobar la diferenciación se analizó la actividad fosfatasa alcalina mediante la tinción con la solución NBT/BCIP (*Nitroblue tetrazolium chloride 5 bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate*, Roche, Basel, Switzerland) y se contrastaron con hematoxilina. Para la diferenciación adipogénica se realizó un procesamiento similar al anterior. Al alcanzar la confluencia, uno de los frascos se incubó con medio de diferenciación a adipocitos (NH Adipodiff Médium, Miltenyi Biotec, Germany) y el otro se incubó con medio de expansión de células mesenquimales y sirvió de control negativo, ambos en las mismas condiciones de humedad, temperatura y concentración de CO₂ durante 21 días. Para comprobar la existencia de células cargadas de grasa se utilizó la tinción con rojo al aceite-O (*Oil-Red_O solution*, Certistain® Merck KGaA, Darmstadt, Germany). Una vez caracterizadas las células, se procedió a poner 3x10⁵ CSM en cultivo en placa de seis pocillos con el β-fosfato tricálcico (KeraOs®) durante cuatro horas con el fin de que las CSM se adhiriesen a dicho material.

Fase quirúrgica y modelo de lesión traumática femoral

La técnica anestésica se practicó empleando gas isofluorano (Forane, Abbott Laboratories). Para la realización del defecto óseo en el fémur de las ratas se procedió a realizar una incisión cutánea longitudinal de aproximadamente 1 cm sobre el cóndilo femoral medial (Fig. 1A). Se diseccionó la fascia muscular y el vasto medial para acceder a la región metafisaria del fémur. La rótula es una buena referencia para la identificación del cóndilo femoral. Se desperiostizó la cara medial de la metafisis distal del fémur para poder centrar bien el orificio, teniendo presente que el diámetro de los cóndilos es de unos 4 mm y el defecto a crear es de 2 mm. El punto central de la perforación se

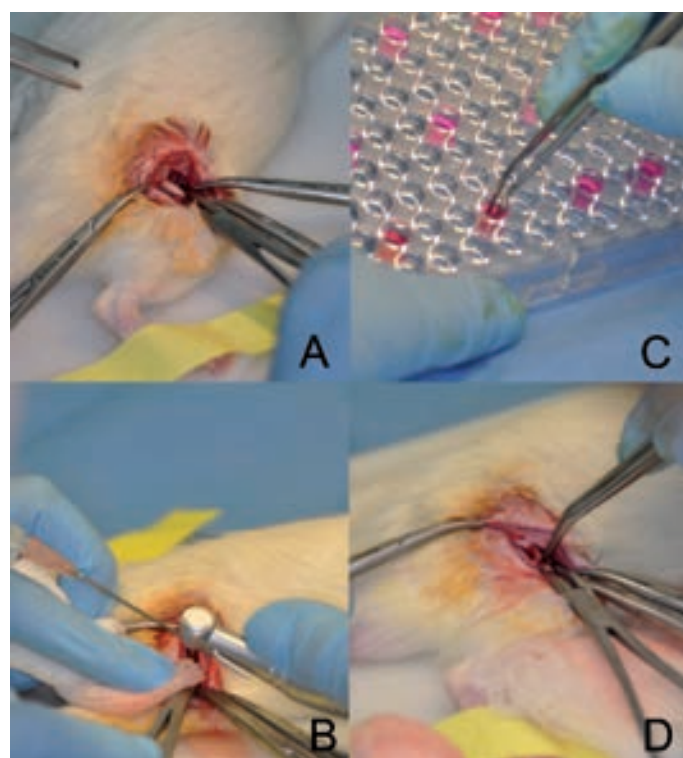


Fig. 1. A: Incisión sobre el fémur del animal experimental. Exposición del campo quirúrgico. B: Realización del defecto óseo. C: Células madre adultas mesenquimales preparadas para la mezcla con el trifosfato cálcico. D: Implante de la mezcla de trifosfato cálcico con las MSC en el defecto óseo.

marcó con un punzón. A continuación se realizó un primer orificio con una broca de 1 mm de diámetro, y posteriormente con una broca de 3 mm para obtener el defecto óseo (Fig. 1B). Una vez completado el defecto cavitario, se lavó con abundante suero fisiológico para eliminar detritus. Se procedió al secado del área mediante una gasa y se colocó el implante correspondiente, según fuera el grupo experimental al que pertenecía el animal. Las células madre mesenquimales siempre se colocaron en el fémur derecho del grupo 2 en combinación con el trifosfato cálcico (Fig 1C y 1D). Finalizada la fase del procedimiento experimental, se procedió a cerrar por planos y estabular los animales de acuerdo al tiempo estimado de evolución antes de realizar la extracción del fémur.

Estudio radiográfico e histológico

En aquellos animales que alcanzaban el tiempo estimado de evolución, dependiendo de los grupos, se procedió a practicar la eutanasia mediante la inyección de sobredosis de pentotal sódico. Se procedió a extraer los fémures y a practicar el estudio radiológico en todos los casos, para posteriormente enviarlo, post-fijados en formol salino al

10%, para su estudio histológico al Departamento de Anatomía e Histología de la Universidad de Salamanca. En el momento en que se inicia el procesado de las muestras, no descalcificadas, las piezas óseas se volvieron a lavar con agua y se realizó un serrado macroscópico en porciones que incluían hueso normal, hueso neoformado y material implantado. Las porciones óseas se introdujeron en casetes y se deshidrataron empleando disoluciones de graduación creciente de etanol (70%, 80%, 90% y 95%), estando embebidas cada día en una de las disoluciones, hasta llegar a etanol absoluto, donde permanecieron dos días.

La inclusión de las muestras se realizó en metilmetacrilato en estado líquido durante 15 días a 4° C en agitación. Se introdujeron los tubos de vidrio en la estufa a 32° C para su polimerización durante cinco y seis días. Seguidamente se rompió el tubo de vidrio, quedando el bloque polimerizado con la muestra ósea, que se cortó con una sierra de cinta para desbastar la muestra, lijándose y colocándose en el microtomo (Microm HM 350 S). Los cortes de 5 µm se colocaron sobre un portaobjetos previamente gelatinizado con gelatina de Haupt. Los portaobjetos se lavaron en soluciones decrecientes de alcohol hasta agua destilada (100%⇒70%). Por último, se procedió a la tinción de las muestras con Von Kossa y tricrómico de Goldner.

Resultados

Se expandieron CSM de todas las muestras seleccionadas de cresta iliaca de donantes voluntarios sanos y se mantuvieron en cultivo hasta tercer pase. La morfología de las CSM fue muy similar en todos los donantes: células con un característico aspecto fibroblástico con largas prolongaciones. Con el fin de comprobar si todas las células obtenidas cumplían los criterios mínimos que indica la ISCT para definir una célula como CSM, realizamos su estudio inmunofenotípico en tercer pase. En todos los casos se alcanzó una pureza de CSM superior al 95%. Todas las CSM presentaron el mismo patrón inmunofenotípico, fueron positivas para CD90, CD73, CD105, CD166, CD106 y negativas para los marcadores de célula hematopoyética CD45, CD34, CD14, CD19 y HLA-DR, sin diferencias significativas entre las distintas muestras para ningún marcador. En todos los casos se obtuvo diferenciación hacia los dos tipos celulares mencionados.

Resultados radiográficos

El estudio radiológico realizado muestra diferencias entre el fémur izquierdo y derecho del mismo animal. Aparecen fracturas en diferentes zonas del fémur, tanto en la zona operatoria con trifosfato cálcico y MSC, como en las zonas

del defecto crítico de control. Se observó que había más fracturas en el fémur derecho, correspondiendo al 65% (n=39) (Fig. 2A). Se colocaron siempre las MSC en el fémur derecho, pero las fracturas observadas en este lado no siempre están en la misma zona operatoria, sólo el 35% de las fracturas corresponden con la zona en la que se implantaron las MSC con el sustitutivo óseo (Fig. 2B). La mayor parte de las fracturas observadas radiográficamente no corresponden con zonas operatorias, sino con el defecto crítico de control realizado. También se observa un incremento significativo del callo de fractura en los fémures derechos (Fig. 2C).



Fig. 2. A: Fractura muy próxima al cóndilo femoral del espécimen n° 7 (grupo 2a) del lado derecho. Se observan restos de trifosfato cálcico en el borde de la fractura. En la parte más distal de la fractura se observa el orificio de control. B: Fractura distal del sustitutivo óseo, coincidiendo con el orificio de la fractura crítica (espécimen n° 21, grupo 2a, del lado derecho). C: Callo óseo del espécimen n° 6 (grupo 2c) del lado derecho.

Resultados histológicos

Se analizaron las muestras considerando los grupos experimentales diseñados:

Grupo 1 (control). A las tres semanas se ha rellenado el hueco de la perforación a expensas de hueso trabecular con abundantes espacios rellenos de médula ósea. Los fenómenos regenerativos óseos ocupan no sólo el espesor correspondiente al hueso diafisario, sino además la parte de la cavidad medular adyacente. Los mismos hallazgos se comprueban a las seis y nueve semanas (Fig. 3A y 3B).

Grupo 2a (experimental). Grupo constituido por los animales que fueron sacrificados a las tres semanas de la inter-

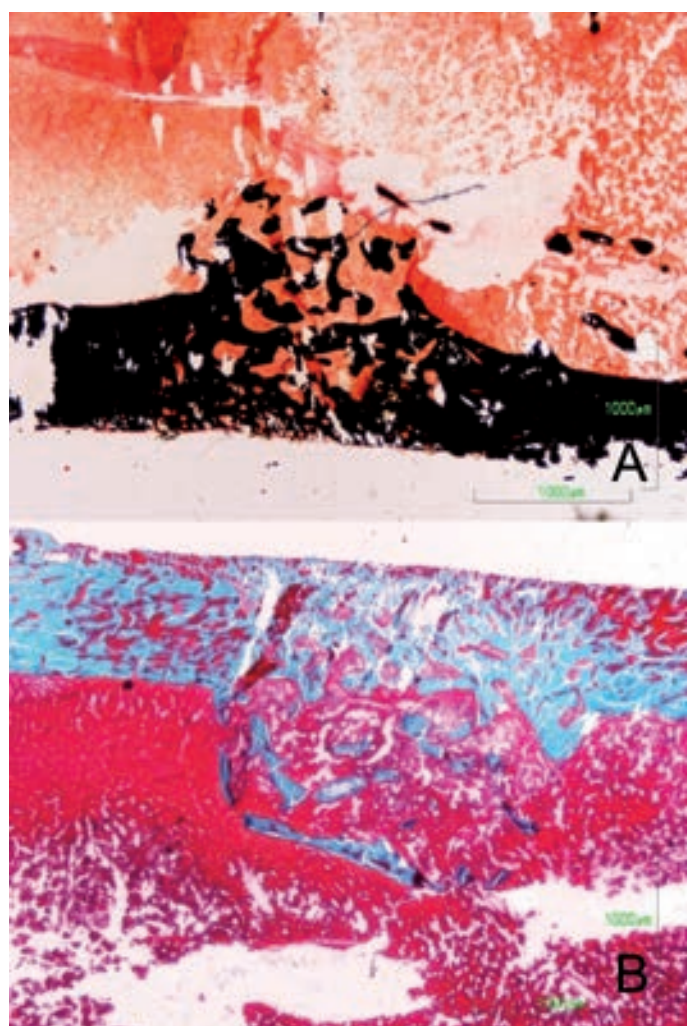


Fig. 3. A: Reparación del defecto óseo sin administración de los productos problema. El hueso cortical diafisario del fémur se ha reemplazado por un hueso trabecular hipertrófico que hace protrusión en la cavidad medular. Von Kossa. 3 semanas post-operatorio. B: Reparación del defecto óseo sin administración de productos problema. El hueso cortical esta reemplazado por hueso trabecular inmaduro hipertrofico. Tricrómico de Goldner. 3 semanas postoperatorio.

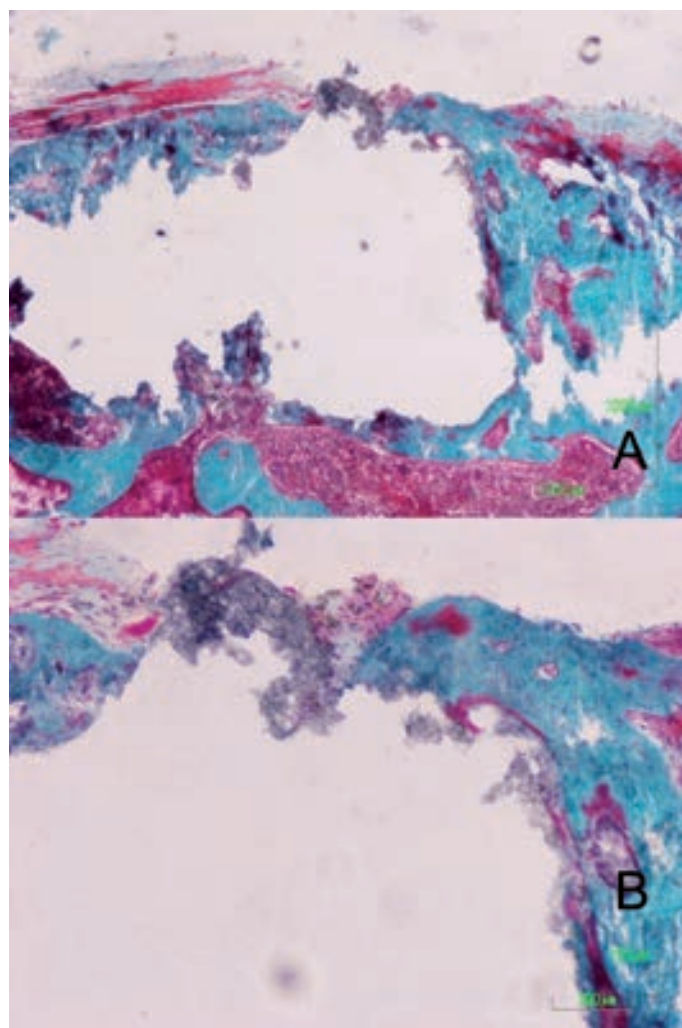


Fig. 4. A: Imagen de la cortical diafisaria con el trifosfato cálcico de color pardo, osteointegrado, rodeado por una capa fina de hueso neoformado. Grupo experimental. 3 semanas de evolución. Tricrómico de Goldner. B: Detalle de la fotografía anterior que muestra la superficie cortical ocupada parcialmente por el trifosfato cálcico, así como algunos macrófagos con fragmentos de cemento en su citoplasma. El hueso adyacente presenta una delgada banda de sustancia osteoide de color rojo. 3 semanas de evolución. Tricrómico de Goldner.

cción. Los animales a los que se les rellenó la cavidad con el sustitutivo óseo muestran en los cortes histológicos acúmulos de cemento rodeados en algunos segmentos por una fina franja de hueso, y en otros tejido conectivo (Fig. 4A y 4B). En aquellas zonas donde el cemento se encuentra delimitado por hueso neoformado (Fig. 4A) se presentan focalmente signos de actividad osteogénica (sustancia osteoide). En zonas donde el cemento está en contacto con el tejido conectivo es posible identificar macrófagos con gránulos de cemento en su interior (Fig. 4B). No se observaron signos inflamatorios, aparte de estos macrófagos, ni se encontra-

ron células multinucleadas. Asimismo, la médula ósea hematopoyética vecina no presentaba alteraciones relevantes. Los defectos óseos tratados con el sustitutivo y las MSC no presentaron diferencias significativas respecto a las cavidades que solo se trataron con el trifosfato cálcico. Se observan áreas con tejido conectivo y con actividad osteogénica, en un grado idéntico al anterior. De igual modo, no se observaron fenómenos inflamatorios, ni células multinucleadas, ni fenómenos de necrosis, ni alteraciones en la médula ósea adyacente.

Grupo 2b (experimental). Grupo constituido por los animales que fueron sacrificados a las seis semanas de la inter-

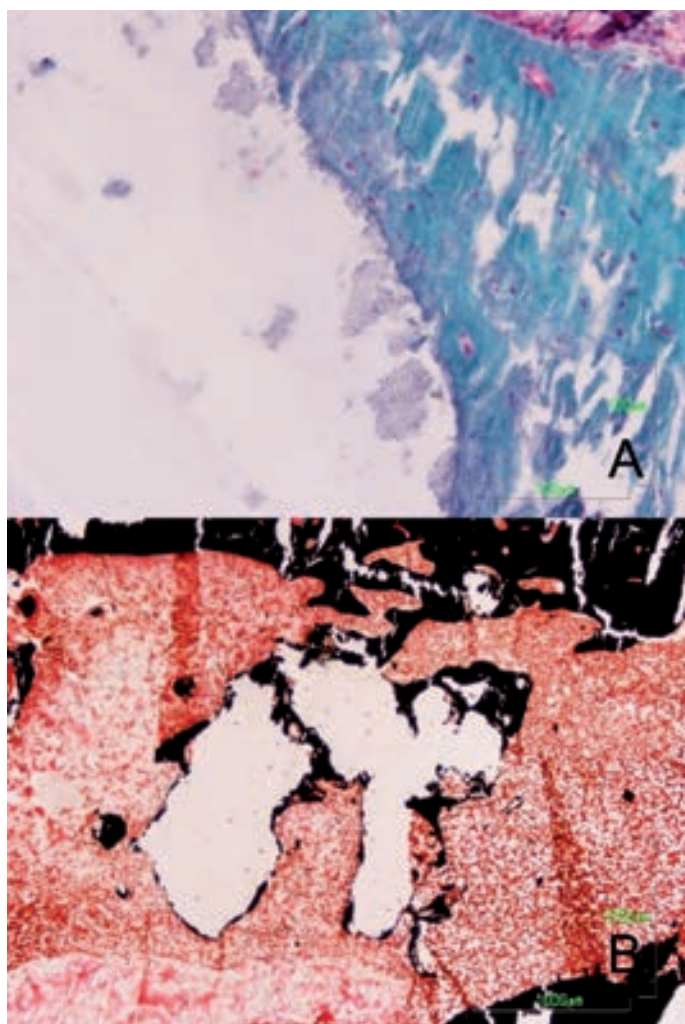


Fig. 5. A: Detalle que muestra la osteointegración del material sin transición de tejido conectivo entre KeraOS® y el hueso neoformado adyacente. Grupo 2b, 6 semanas evolución. Tricrómico de Goldner. B: Panorámica que muestra la osteointegración de KeraOS® junto con células madre. El trifosfato cálcico se observa rodeado por una fina capa de hueso neoformado. Médula ósea hematopoyética sin alteraciones. Grupo 2b, 6 semanas de evolución. Von Kossa.

vención. Las imágenes histológicas muestran que las zonas de hueso que rodean a los acúmulos de cemento presentan en algunas áreas un mayor espesor. En algunas zonas el cemento contacta con tejido conectivo. El hueso neoformado, en contacto directo con el cemento, es de tipo trabecular. No se observaron alteraciones inflamatorias, ni alteraciones medulares relevantes (Fig. 5A y 5B).

Grupo 2c (experimental). Grupo constituido por los animales que fueron sacrificados a las nueve semanas de la intervención. Los resultados muestran que, independientemente de la administración del trifosfato solo o en combinación con MSC, el comportamiento histológico fue similar al grupo 2b. Persisten los acúmulos de cemento en la cavidad medular, rodeada por una franja de tejido óseo neoformado. En algunos puntos persiste tejido conectivo en contacto con el cemento (Fig. 6A y 6B). No existen signos inflamatorios, ni alteraciones medulares relevantes.

I Discusión

Los resultados obtenidos no permiten afirmar diferencias de comportamiento biológico significativas en este modelo experimental entre los animales a los que se les administró un sustitutivo óseo (KeraOs®) y el mismo sustitutivo en combinación con MSC, ni tampoco al comparar estos mismos grupos con los controles de defecto óseo vacío. Aunque se demuestra actividad osteogénica en el caso de la asociación del trifosfato cálcico con MSC, los resultados histológicos no permiten afirmar que esta actividad sea especialmente relevante. Por otra parte, no se han observado fenómenos inflamatorios marcados, a excepción de los macrófagos encontrados en las primeras etapas, a las tres y seis semanas, y tampoco se han evidenciado células multinucleadas. El hueso neoformado en torno al sustitutivo óseo administrado no presenta actividad sintética en la etapa más tardía, correspondiente a las nueve semanas.

Estos hallazgos están en consonancia con algunas de las últimas publicaciones [10,11], donde Vahabi *et al.* recogen que no existen cambios en la regeneración ósea obtenida en un modelo canino en alveolos post-extracción, tanto con células madre en asociación con beta-fosfato tricálcico, como empleando hidroxiapatita bovina Bio-Oss®, siempre en comparación con un grupo control con un defecto óseo vacío. Sin embargo, los resultados iniciales de este estudio orientan hacia la utilización de un sustitutivo óseo en condiciones distintas a las empleadas, tal y como se afirma en otras publicaciones [12-15], que muestran cómo la actividad regenerativa de las células madre en el fémur de la rata es significativa cuando se utilizan asociaciones con factores de crecimiento y plasma rico en plaquetas.

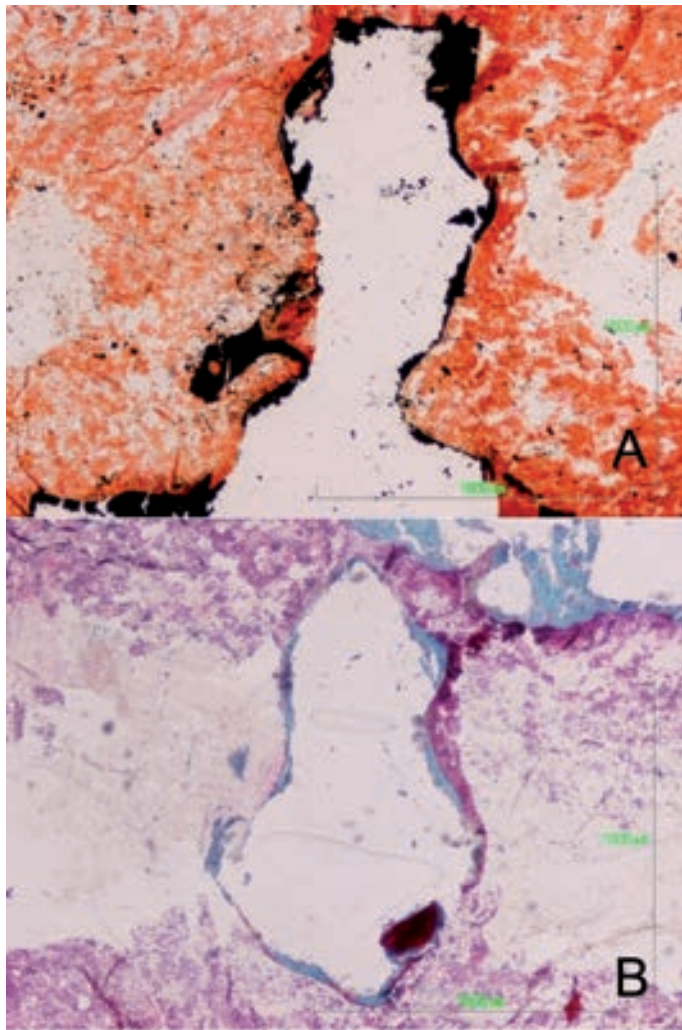


Fig. 6. A: Panorámica con la técnica de Von Kossa, que muestra el cemento rodeado por una fina franja de tejido óseo neoformado, aunque en algunas zonas se conserva la relación del KeraOS® con el tejido conectivo y la médula adyacente. Grupo 2c, 9 semanas de evolución. Von Kossa. B: Panorámica de un caso con KeraOS® y células madre que muestra la envoltura del trifosfato cálcico por tejido óseo neoformado de espesor similar al presente en la fotografía anterior. Grupo 2c, 9 semanas evolución. Técnica de Goldner.

En conclusión, es necesario realizar nuevas investigaciones perfeccionando el modelo experimental y fundamentalmente adaptando el sustitutivo óseo a los requerimientos en este caso de las células madre. El estudio pone de manifiesto la importancia de encontrar un transportador apropiado para las MSC con una degradación óptima y una superficie osteoconductiva, sobre el cual la regeneración del hueso pueda tener lugar. Todavía sigue siendo un reto encontrar el equilibrio correcto entre las propiedades biológicas y físicas del material de soporte. A pesar de que existen numerosos estudios demostrando el potencial de las MSC [16-22], en

el momento actual se pone en tela de juicio la calidad de muchas de estas publicaciones y de los resultados obtenidos [23], dejando en evidencia que es necesario potenciar la investigación en la fase experimental para poder dar el paso a la aplicación de la técnica en humanos. ■

Agradecimientos

Agradecemos la colaboración del Laboratorio de Terapia Celular del Hospital Universitario de Salamanca, y del Departamento de Anatomía e Histología de la Universidad de Salamanca. Asimismo, agradecemos la financiación de FUNDACIÓN MAPFRE a través de las Ayudas Económicas a la Investigación que han hecho posible este proyecto.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Plánka L, Starč D, Srnec R, Necas A, Gál P. New options for management of posttraumatic articular cartilage defects. *Rozhl Chir* 2008; 87:42-5.
2. Hernández-Alfaro F, Ruiz-Magaz V, Chatakun P, Guijarro-Martínez R. Mandibular reconstruction with tissue engineering in multiple recurrent ameloblastoma. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2012; 32:82-6.
3. Justesen J, K Stenderup, Kassem MS. Mesenchymal stem cells. Potential use in cell and gene therapy of bone loss caused by aging and osteoporosis. *Ugeskr Laeger* 2001; 163:5491-5.
4. Prósper F, Gavira JJ, Herreros J, Rábago G, Luquín R, Moreno J, *et al.* Cell transplant and regenerative therapy with stem cells. *An Sist Sanit Navar* 2006; 29(Suppl 2):219-34.
5. Mason C, Dunnill P. A brief definition of regenerative medicine. *Regen Med* 2008; 3:1-5.
6. Ringe J, Kaps C, Burmester GR, Sittlinger M. Stem cells for regenerative medicine: advances in the engineering of tissues and organs. *Naturwiss* 2002; 89:338-51.
7. Koc ON, Lazarus HM. Mesenchymal stem cells: heading into the clinic. *Bone Marrow Transplant* 2001; 27:235-9.
8. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, *et al.* Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999; 284:143-7.
9. Dominici M, Le BK, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, *et al.* Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006; 8:315-7.
10. Jafarian M, Eslaminejad MB, Khojasteh A, Mashhadi Abbas F, Dehghan MM, Hassanizadeh R, *et al.* Marrow-derived mesenchymal stem cells-directed bone regeneration in the dog mandible: A comparison between biphasic calcium

- phosphate and natural bone mineral. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2008; 105:14-24.
11. Vahabi S, Amirizadeh N, Shokrgozar MA, Mofeed R, Mashhadi A, Aghaloo M, *et al.* A comparison between the efficacy of Bio-Oss, Hydroxyapatite tricalcium phosphate and combination of mesenchymal stem cells in inducing bone regeneration. *Chang Gung Med J* 2012; 35:28-37.
 12. Behnia H, Khojasteh A, Kiani MT, Khoshzaban A, Abbas FM, Bashtar M, *et al.* Bone regeneration with a combination of nanocrystalline hydroxyapatite silicagel platelet rich in growth factor, and mesenchymal stem cell: A histological study in rabbit calvaria. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2012; 115:7-15.
 13. Behnia H, Khojasteh A, Soleimani M, Tehranchi A, Atashi A. Repair of alveolar cleft defect with mesenchymal stem cells and platelet derived growth factors: A preliminary report. *J Craniomaxillofac Surg* 2012; 40:2-7.
 14. Khojasteh A, Baghaban Eslaminejad M, Nazarian H, Morad G, Dashti SG, Behnia H, *et al.* Vertical bone augmentation with simultaneous implant placement using particulate mineralized bone and mesenchymal stem cells: A preliminary study in rabbit. *J Oral Implantol* 2013; 39:3-13.
 15. Rai B, Teoh SH, Ho KH. An in vitro evaluation of PCL-TCP composites as delivery systems for platelet rich plasma. *J Controlled Release* 2005; 107:330-42.
 16. Akita S, Fukui M. Ectopic bone formation by human mesenchymal stem cells and osteogenic cytokines in a nude rat superficial Epigastric flap model. *Jap J Plastic Reconstr Surg* 2004; 47:983-92.
 17. Gu F, Amsed B, Neufeld R. Sustained delivery of vascular endothelial growth factor with alginate beads. *J Control Rel* 2004; 96:463-72.
 18. Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzales XR, *et al.* Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 2002; 418:41-9.
 19. Krut MC. Viable osteogenic cells are obligatory for tissue-engineered ectopic bone formation in goats. *Tissue Eng* 2003; 9:327-36.
 20. Lennon DP, Haynesworth SE, Arm DM, Baber MA, Caplan AI. Dilution of human mesenchymal stem cells with dermal fibroblasts and the effects on in vitro and in vivo osteochondrogenesis. *Dev Dyn* 2000; 219: 50-62.
 21. Marie PJ, Fromiguet O. Osteogenic differentiation of human marrow-derived mesenchymal stem cells. *Regen Med* 2006; 1:539-48.
 22. Minguell JJ, Erices A, Conget P. Mesenchymal stem cells. *Exp Biol Med (Maywood)* 2001; 226:507-20.
 23. Mangano FG, Tettamanti L, Sammons RL, Azzi L, Caprioglio A, Macchi A, *et al.* Maxillary sinus augmentation with adult mesenchymal stem cells: a review of the current literature. *Oral Surg Med Oral Pathol Oral Radiol (in Press)*, 2013.

Conflicto de intereses

Los autores hemos recibido ayuda económica de FUNDACIÓN MAPFRE para la realización de este trabajo. No hemos firmado ningún acuerdo por el que vayamos a recibir beneficios u honorarios por parte de alguna entidad comercial o de FUNDACIÓN MAPFRE.