

Corrección de defectos óseos en el área de Ingeniería tisular

Correction of bone defects by tissue Engineering

Rosa Alicia Saucedo Acuña*, Mónica Galicia García*, Judith Virginia Ríos Arana*, Simón Yobanny Reyes López*

RESUMEN

Hoy en día, los defectos óseos representan uno de los casos de mayor impacto en la salud debido a la frecuencia con que éstos ocurren a causa de traumatismos, fracturas, enfermedades congénitas o degenerativas. En la actualidad, los implantes de tejido óseo de gran volumen se encuentran severamente restringidos a causa de las limitaciones de difusión en la interacción con el ambiente del huésped para los nutrientes, intercambio gaseoso y eliminación de desechos. Es por ello que la corrección de los defectos óseos ha cobrado gran importancia en el área de Ingeniería tisular buscando mejorar las estrategias clínicas para su tratamiento. El propósito de esta revisión es proporcionar un panorama general del desarrollo de andamios para la regeneración de tejido óseo, mostrando los avances logrados en los ensayos *in vitro* e *in vivo* en la última década.

ABSTRACT

Currently, bone defects cases represent a major impact on health due to how often they occur because of trauma, fractures, congenital or degenerative diseases. Now, bone implants to large volume are severely restricted because of the diffusion limitations in the interaction with the environment of the host for nutrients, gas exchange and waste disposal. That is why the correction of bone defects has become very important in the field of tissue engineering looking to improve clinical strategies for treatment. The purpose of this review is to provide an overview of the development of scaffolds for bone tissue regeneration, showing the progress made in the *in vitro* and *in vivo* in recent decades.

INTRODUCCIÓN

En los años 80s, la pérdida total o parcial de tejido a consecuencia de algún trauma o enfermedad era tratada principalmente con dispositivos metálicos y materiales de relleno; ello promovió en esa década el desarrollo de nuevos materiales para uso biomédico conocidos como “andamios” o “matrices de soporte” (mismos que han sido enriquecidos con factores de crecimiento y con el cultivo de células), con el fin de desarrollar sustitutos biológicos que restablezcan, mantengan o mejoren la función de tejidos y órganos dañados. Con ese esfuerzo se dio lugar a lo que hoy conocemos como “Ingeniería tisular” [1-3]. Y es que a diferencia de la medicina regenerativa que busca inducir el crecimiento de tejido *in vivo*, la Ingeniería tisular trabaja en el desarrollo de tejidos *in vitro*, de tal forma que hoy permite contar con sistemas empleados en medicina fisiológicamente eficaces y mecánicamente funcionales [4]. Por esta razón, uno de los objetivos primordiales en el área de Ingeniería de tejidos es la obtención y caracterización de superficies para su aplicación como matriz de soporte [5].

Si bien la Ingeniería tisular ha experimentado un crecimiento significativo en las últimas tres décadas, aún continua enfrentando un gran obstáculo: el manejo de grandes volúmenes de tejido implantado capaces

Recibido: 29 de mayo de 2012
Aceptado: 7 de noviembre de 2012

Palabras clave:
Ingeniería tisular; regeneración ósea; andamios.

Keywords:
Tissue engineering; bone regeneration; scaffolds.

*Departamento de Ciencias Químico-Biológicas. Instituto de Ciencias Biomédicas. Universidad Autónoma de Ciudad Juárez (UACJ). Anillo Pronaf y Estocolmo s/n, zona Pronaf, C. P. 32310, Cd. Juárez, Chihuahua, México. Tel. (52) 656-6881821, fax (52)656-6881821. Correo electrónico: rosauced@uacj.mx

de estimular la vascularización necesaria para su supervivencia [6]. Lo anterior debido tanto a la falta de abastecimiento vascular, como a la dificultad para reproducir las interacciones físicas (rigidez del sustrato y arquitectura) y químicas (citocinas y factores de crecimiento) del entorno de las células *in vivo* -lo que ha desencadenado el fracaso en implantes de grandes dimensiones [7]. De ahí que actualmente se desarrollen biomateriales capaces de reproducir el microambiente celular *in vivo*, de tal forma que se logre sustituir funcionalmente las estructuras dañadas y ayudar a regenerar los órganos y tejidos del cuerpo humano [8].

En cuanto al área de materiales con fines biomédicos, hoy en día las opciones biomédicas abarcan el uso de materiales acelulares y celulares, así como dispositivos biomecánicos o prótesis. Estos últimos se limitan al uso de materiales metálicos, poliméricos y/o cerámicos que con el paso del tiempo o al contacto con enzimas no generen problemas de biocompatibilidad, desgaste o toxicidad [2]. En cambio, los materiales acelulares y celulares forman parte de las propuestas de la Ingeniería tisular: los materiales acelulares, aunque no son enriquecidos con células, son porosos y ayudan a la regeneración del tejido para finalmente ser bioadsorbidos con el paso del tiempo; los materiales celulares funcionan como andamios o matrices de soporte que contienen células, las cuales ayudan a la regeneración del tejido mientras el andamio o matriz de soporte es también biodegradado en el organismo. Para ello, los materiales seleccionados como andamios deben llevar a cabo una función adecuada y no ocasionar ningún daño al organismo (tabla 1), lo que limita las materias primas con las que se puede abordar su diseño [9, 10].

Tabla 1.

Requisitos de un material para su uso en aplicaciones médicas.

1. Ser biocompatible, no provocar mecanismos de rechazo ante la presencia del material.
2. Ser químicamente estable, o biodegradable en productos no tóxicos.
3. Que las propiedades mecánicas sean similares a las que exhibe el tejido a restablecer o sustituir.
4. Que las características superficiales, es decir, que la distribución y tamaño de poro facilite la biointegración del material.
5. El precio debe ser reducido para que su fabricación sea reproducible y que su procesamiento sea fácil a gran escala.

PARADIGMA DE LA INGENIERÍA TISULAR

Precisamente la Ingeniería tisular no ha logrado con éxito la implantación de grandes volúmenes de tejido óseo, razón por la cual los esfuerzos más recientes buscan la inducción de la regeneración (muy diferente

a la reparación o reemplazo del hueso, donde por lo general la reparación o reemplazo no llega a producir tejidos totalmente funcionales) [7, 9, 14-18]. Para esto se han realizado distintos esfuerzos por obtener un bioreactor de tejido óseo óptimo, en el que la matriz sea capaz de imitar las propiedades del hueso natural, a la par de que las células empleadas para el enriquecimiento de dicha matriz induzcan el desarrollo de tejido *de novo*. Un bioreactor es, entonces, el sistema en el que las células interactúan con su medio nutritivo, operando como una estructura de soporte o, dicho de otra manera, es un dispositivo capaz de soportar un ambiente biológicamente activo destinado al crecimiento de células y/o tejidos. Un ejemplo sencillo de un bioreactor continuo es el quimiostato o una placa de Petri con gel agar [19, 20]. Por tanto, la etapa final del paradigma central de la Ingeniería tisular es la incorporación de la estructura matriz/células/factores para el trasplante de un volumen de tejido reconocible.

Tabla 2.

Paradigma central de la Ingeniería tisular.

Paradigma central:

- Abastecimiento de células.
- Expansión y manipulación de células.
- Siembra de células y expresión en matriz extracelular.
- Señalizaciones mecánicas y moleculares.
- Implantación del producto = bioreactor.
- Total incorporación en el paciente.

Variaciones del paradigma central:

- Abastecimiento de células: totalmente diferenciadas, células madre embrionarias, células madre adultas, de origen alogénico o autólogo.
- Expansión, manipulación y siembra: factores de crecimiento, transferencia génica.
- Implantación del producto = bioreactor: matriz preformada con células.
- Señalización mecánica y molecular: *in vivo*.
- Expresión de matriz extracelular: *in vivo*.
- Total desarrollo dentro del paciente.

CAMINO A LA OBTENCIÓN DE BIOREACTORES ÓSEOS: DESARROLLO DE MATRICES DE SOPORTE O ANDAMIOS

Las matrices o andamios tridimensionales proporcionan a las células el soporte necesario para que puedan proliferar, mantener sus funciones y la señalización biológica requerida para la conservación de la expresión génica específica y para definir la arquitectura del

tejido [21]. Polímeros biodegradables de origen natural o sintético han sido los indicados para la obtención de estas matrices temporales, mostrando resultados prometedores dentro de las aplicaciones médicas de regeneración ósea [22, 23]. Estos soportes en interacción con las células inducen la liberación de factores de diferenciación y crecimiento, proporcionando el ambiente específico del tejido en el sitio afectado del paciente, de

tal forma que se promueva la reproducción del tejido faltante [24]. Particularmente, las matrices desarrolladas para su uso en el desarrollo de tejido óseo deben satisfacer los siguientes criterios: biocompatibilidad, porosidad, superficie rugosa, osteoinductividad, propiedades mecánicas y biodegradabilidad [25–27]. La tabla 3 muestra un recorrido a través de los años más recientes en el desarrollo de los materiales con fines biomédicos [11, 12, 28].

Tabla 3.
Biomateriales y sistemas utilizados en Medicina.

| | |
|------------|---|
| 1930-1940 | Uso generalizado del ácido poliláctico (PLA), que por sus características mecánicas ha sido empleando para implantes en hueso y suturas reabsorbibles. |
| 1940-1950 | Investigación y desarrollo de prótesis, como la prótesis de cadera de Charnley. |
| 1950-1960 | Se establece que la integridad de los biomateriales para implantes y prótesis depende de su naturaleza no tóxica para minimizar una respuesta inflamatoria. |
| 1960-1970 | Se publican los primeros estudios sobre las lesiones provocadas por la presencia de un implante y se introduce el término “biocompatibilidad”, que define el grado de tolerancia del biomaterial por parte del organismo. |
| 1970-1980 | Continúa la determinación de las características de los biomateriales para implantes, introduciendo técnicas para su caracterización de otras ciencias como la Biología y la Bioquímica. Tal es el caso de los trabajos de Chick, quien desarrolla un implante con la intención de regenerar la dermis de pacientes con quemaduras a partir de colágeno y glicosaminoglicanos. |
| 1980-1990 | Desarrollo de construcciones basadas en componentes sintéticos y biológicos (conocidos como “biomiméticos”), biohíbridos o productos de combinación, tales como los injertos vasculares recubiertos con colágeno y los polímeros biodegradables para la liberación de drogas. |
| 1990-2000 | Los estudios se centran en el conocimiento más exhaustivo de las interacciones biológicas tejido-material con la incorporación de técnicas de biología molecular y, más recientemente, la Ingeniería tisular. En la regeneración de tejido óseo, el material acelular de mayor uso fue un hueso desmineralizado empleado como matriz ósea, conocida como <i>DeminerIALIZED Bone Matrix</i> (o DMB por sus siglas en inglés). En cuanto a materiales celulares empleados como andamios óseos, el colágeno fue uno de los más empleados. |
| 2000-2010 | Una propuesta acelular con gran auge fue el compuesto conformado por material polimérico e hidroxiapatita. El uso de proteínas morfogénicas óseas (<i>Bone Morphogenetic Protein</i> o BMP por sus siglas en inglés) adquiere una gran importancia en la formación y regeneración del tejido óseo (proteínas que junto con la hidroxiapatita mejoran sus resultados). El uso del colágeno enriquecido con calcio facilita el cultivo de condrocitos promoviendo la obtención de un material bioactivo que favorece la actividad biológica que ayuda a la regeneración del tejido. En 2007, Kim y colaboradores elaboran un hidrogel a base de ácido hialurónico, buscando crear un andamio de soporte para células madres y BMP-2 -con buenos resultados en la formación de hueso. Por otro lado, también en 2007, se recomendó el uso de células mesenquimales para la regeneración de tejido óseo. Dichas células han sido depositadas en andamios de hidroxiapatita y fosfato tricálcico, los cuales han mostrado ser los mejores andamios debido a sus características osteoinductivas. En cambio, materiales como el sílice iniciaron su uso con fuerza en esta década gracias a sus propiedades osteoactivas, ya que al entrar en contacto con los fluidos corporales forman apatita. Éste es un componente inorgánico de los huesos, dando al sílice una característica osteoinductora, pero -debido a su baja capacidad de degradación y a sus escasas propiedades mecánicas en 2010- se comenzó a limitar su uso. Dentro la investigación de biomateriales para uso médico, queda manifiesta la necesidad de integrar numerosas disciplinas para comprender el sistema biológico y su respuesta. Desarrollo de bioreactores para la regeneración de tejido. |
| 2010-Fecha | Se reporta la regeneración ósea de dientes en conejos a las 5 semanas de implantación de un hidrogel compuesto de gelatina y ácido L-láctico con simvastatina (resultado posible gracias a que la simvastatina es una proteína que tiene la capacidad de inducir la formación de osteoblastos). Ahora bien, en cuanto al reporte de regeneración ósea mediante el uso de andamios o matrices de soporte, actualmente los trabajos que se han reportado con éxito para tejido óseo han sido siempre reportados para la regeneración de pequeñas regiones de pérdida de tejido. Respecto a la regeneración de grandes defectos óseos -como la regeneración completa de un hueso largo-, no existe aún un trabajo que describa tal beneficio. De ahí que la tendencia actual siga siendo la búsqueda de una matriz de soporte que dirija con éxito el crecimiento de los osteocitos cultivados en regiones de gran pérdida ósea. |

OPCIONES PARA EL ENRIQUECIMIENTO DE LAS MATRICES DE SOPORTE PARA TEJIDO ÓSEO

Para enriquecer las matrices de soporte de regeneración ósea se requiere de la asociación de células con propiedades osteogénicas potenciales [29]. De acuer-

do a lo anterior, es posible regenerar tejido óseo a partir de la incorporación de células vivas osteoprogenitoras y factores de crecimiento en una matriz osteoconductiva/osteoinductiva apropiada -que en cooperación promueva el crecimiento del hueso [25, 30]. Una opción

viable es el uso de células madre, las cuales son células inmaduras e indiferenciadas que pueden dividirse y multiplicarse. Las células madre pueden ser totipotentes, multipotentes o unipotentes, esto es, capaces de diferenciarse en cualquier tipo de tejido, en algunos tipos de tejidos o en un solo tipo de tejido -respectivamente [31–33].

Los 3 grandes grupos de células madre multipotentes son: las ectodérmicas (piel y nervios), mesodérmicas o mesenquimales (hueso, cartílago, músculo y adiposo) y endodérmicas (intestinos y otros). Dentro de las células madre, las que provienen de células adultas como el cordón umbilical, el fluido amniótico, la médula ósea, el tejido adiposo, el cerebro o los dientes ofrecen la ventaja de no encontrarse sujetas a la controversia de ser obtenidas de un embrión humano.

De los 3 tipos de células madre, las células madre mesenquimales osteoprogenitoras son las más apropiadas para enriquecer los andamios óseos, debido a que los osteoblastos se derivan de estas células existentes en el estroma de la médula ósea -a las que comúnmente se les conoce como “células madre mesenquimales” (*Mesenchymal Stem Cells* o MSC por sus siglas en inglés) o “células del estroma medular”. En este sentido, las MSC nativas resultan ser la mejor opción, ya que pueden diferenciarse en múltiples linajes celulares dando origen a los tejidos conectivos -que incluyen hueso, cartílago, tejido adiposo, tendones y músculo [34–36].

De hecho, ya en los años 70s era bastante común la extracción de células de médula ósea postnatal para la diferenciación en hueso, cartílago y células adiposas, pero ha sido en los años más recientes que las células madre mesenquimales derivadas de médula ósea se han diferenciado en medios de cultivo o después de su implantación *in vivo* a osteoblastos, condrocitos, adipocitos y miocitos [37].

ENSAYOS *IN VITRO* E *IN VIVO*

Como ya se ha mencionado, la estructura ósea elaborada a partir de Ingeniería tisular promete ser una opción viable para el tratamiento de pérdidas óseas a gran escala. A continuación se resume en la tabla 4 diferentes ensayos *in vitro* e *in vivo* que lograron el desarrollo a largo plazo de tejido óseo normal.

Tabla 4.
Paradigma central de la Ingeniería tisular.

| | |
|-----------|---|
| 1995-2005 | Regeneración de defectos femorales de 8 mm en modelos murinos, caninos y ovinos al emplear matrices cerámicas enriquecidas con MSC provenientes de médula ósea [38-42]. |
| 2004-2005 | Combinación de factores de crecimiento y células preosteogénicas en matrices poliméricas para la regeneración de hueso [43-47]. |
| 2003-2007 | Regeneración de cóndilo mandibular gracias al encapsulamiento de MSC provenientes de médula ósea en hidrogeles de poli-diacrilato [48-51]. |
| 2005-2007 | El enriquecimiento de matrices con MSC provenientes de médula ósea humana para la diferenciación a linajes osteogénicos [30, 52–56]. |
| 2006-2007 | Aumento de neovascularización y regeneración de hueso en defectos óseos irradiados al emplear matrices con factores de crecimiento angiogénicos [57, 58]. |
| 2005-2009 | Crecimiento de MSC en matrices cerámicas para la reparación de defectos en la bóveda craneal de murinos [29, 59, 60]. |
| 2008-2009 | Enriquecimiento de matrices poliméricas con MSC como potencial regenerativo óseo en conejos y perros [61-64]. |
| 2005-2011 | Se reportan propiedades osteoinductivas al emplear matrices biocerámicas en ensayos con cerdos, ovejas, conejos y otros modelos de grandes especies [65-70]. |

CONCLUSIONES

La Ingeniería de tejido en las últimas décadas se ha convertido en un área de la ciencia que nos despliega una alternativa más para la regeneración y creación de tejido óseo *de novo* con el uso de estructuras tridimensionales o matrices enriquecidas que pueden proveer de manera autóloga el sistema de reparación y regeneración de hueso a grandes volúmenes. Estas estructuras de hueso 3D cuentan con tres elementos importantes: 1) células autólogas con propiedades osteoinductivas -tales como las MSC-, 2) una matriz con capacidad osteoconductiva y osteoinductiva y 3) la presencia de factores de crecimiento con potencial osteoinductivo necesario para la inducción de la reproducción tisular en el sitio diana afectado (de tal forma que la matriz 3D actúe como un andamio temporal para las células hasta que el nuevo tejido haya sido generado). Los resultados anteriormente mostrados sugieren que, en cuanto a la regeneración de tejido óseo, la Ingeniería tisular ha logrado el desarrollo de tejido sano neovascularizado tanto en hueso corto como largo, siendo el reto actual la obtención de matrices de soporte cuyas características permitan cubrir regiones faltantes de hueso de gran tamaño -como las que se producen en el caso de cáncer maxilofacial, por mencionar alguno.

REFERENCIAS

- [1] Saxena, A. K. (2005). Tissue engineering: Present concepts and strategies. *J Indian Assoc Pediatr Surg* 10(1): pp. 14-16.
- [2] Estrada, C., Paz, A. C. y López, L. E. (2006). Ingeniería De Tejido Óseo: Consideraciones Básicas. *EIA* 5: pp. 93-100.
- [3] Skalak, R. and Fox, C. F. (1988). *Tissue Engineering, Proceedings for a Workshop held at Granlibakken*, Lake Tahoe, California en UCLA Simposium on molecular and celular biology.
- [4] Binyamin, G., Shafi, B. M. and Mery, C. M. (2006). Biomaterials: a primer for surgeons. *Semin Pediatr Surg* 15(4): pp. 276-283.
- [5] Sabino, N. G. and Marcos, A. (2008). Modificación de superficies de biomateriales poliméricos y estudios de biocompatibilidad. *Revista Iberoamericana de Polímeros* 9(3): pp. 206-210.
- [6] Largo Remo, A., Ramakrishnan, V., Ehrbar, M., Ziogas, A., Plock, J. and Eberli, D. (2011). Angiogenesis and Vascularity for Tissue Engineering Applications. En *Regenerative Medicine and Tissue Engineering-Cells and Biomaterials*. InTech Open Access Publisher-Open Science. USA.
- [7] Gauvin, R. and Khademhosseini, A. (2011). Microscale technologies and modular approaches for tissue engineering: Moving toward the fabrication of complex functional structures. *ACS Nano* 5(6): pp. 4258-4264.
- [8] Mata, A., Geng, Y., Henrikson, K. J., Aparicio, C., Stock, S. R., Satcher, R. L. and Stupp, S. I. (2010). Bone regeneration mediated by biomimetic mineralization of a nanofiber matrix. *Biomaterials* 31(23): pp. 6004-6012.
- [9] Lizarbe, M. A. (2007). Sustitutivos de tejidos: de los biomateriales a la ingeniería tisular. *Rev R Acad Cienc Exact Fis Nat* 101(1): pp. 227-249.
- [10] Williams, D. F. (2009). On the nature of biomaterials. *Biomaterials* 30(30): pp. 5 897-5 909.
- [11] Binyamin, G., Shafi, B. M. and Mery, C. M. (2006). Biomaterials: a primer for surgeons. *Semin Pediatr Surg* 15(4): pp. 276-283.
- [12] Anderson, J. M. (2006). The future of biomedical materials. *J Mater Sci Mater Med* 17(11): pp. 1025-1028
- [13] Williams, D. F. (2006). *To engineer is to create: the link between engineering and regeneration*. UK Centre for Tissue Engineering. University of Liverpool. Liverpool, UK.
- [14] Rinna, C., Ungari, C., Saltarel, A., Cassoni, A. and Reale, G. (2005). Orbital floor restoration. *J Craniofacial Surg* 16(6): pp. 968-972.
- [15] Logeart-Avramoglou, D., Anagnostou, F., Bizios, R. and Petite, H. (2005). Engineering bone: challenges and obstacles. *J. Cell Mol. Med* 9(1): pp. 72-84.
- [16] Eski, M., Sahin, I., Devenci, M., Turegun, M., Isik, S. and Sengezer, M. (2006). A retrospective analysis of 101 zygomatico-orbital fractures. *J Craniofacial Surg* 17(6): pp. 1059-1064.
- [17] Jabbarzadeh, E., Stames, T., Khan, Y. M., Jiang, T., Wirtz, A. J., Deng, M., Lv, Q., Nair, L. S., Doty, S. B. and Laurencin, C. T. (2008). Induction of angiogenesis in tissue-engineered scaffolds designed for bone repair: A combined gene therapy- cell transplantation approach. *PNAS* 105(32): pp. 11 099-11 104.
- [18] Betz, M. W., Yeatts, A. B., Richbourg, W. J., Caccamese, J. F., Coletti, D. P., Falco, E. E. and Fisher, J. P. (2010). Macroporous hydrogels upregulate osteogenic signal expression and promote bone regeneration. *Biomacromol* 11(5): pp. 1160-1168.
- [19] Nic, M., Jirat, J. and Kosata, B. (2006). Bioreactor. En *Compendium of Chemical Terminology* (online ed.). International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC).
- [20] Decker, E. L. and Reski, R. (2008). Current achievements in the production of complex biopharmaceuticals with moss bioreactors. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 31(1): pp. 3-9.
- [21] Zhao, X., Kim, J., Cezar, C. A., Huebsch, N., Lee K., Bouhadir, K. and Mooney, D. J. (2011). Active Scaffolds for On-demand Drug and Cell Delivery. *PNAS* 108(1): pp. 67-72.
- [22] Park, H., Cannizzaro, C., Vunjak-Novakovic, G., Langer, R., Vacanti, C. A. and Farokhzad, O. C. (2007). Nanofabrication and microfabrication of functional materials for tissue engineering. *Tissue Eng* 13(8): pp. 1867-1877.
- [23] Kanczler, J. M. and Oreffo, R. O. C. (2008). Osteogenesis and angiogenesis: the potential for engineering bone. *European Cells and Materials* 15: pp. 100-114.
- [24] Balakrishnan, B. and Banerjee, R. (2011). Biopolymer-Based Hydrogels for Cartilage Tissue Engineering. *Chem. Rev* 111(8): pp. 4 453-4 474.
- [25] Lu, Q., Ganesan, K., Simionescu, D. T. and Vyavahare, N. R. (2004). Novel porous aortic elastin and collagen scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials* 25(22): pp. 5 227-5 237.
- [26] Jones, J. R., Ehrenfried, L. M. and Hench, L. L. (2006). Optimising bioactive glass scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* 27(7): pp. 964-973.
- [27] Williams, D. F. (2008). On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials* 29(20): pp. 3 047-3 052.
- [28] Yannas IV, and Burke JF. (1980). Design of an artificial skin. II. Control of chemical composition. *J Biomed Mater Res* 14(2): pp. 107-132.
- [29] Jones, J. R. and Hench, L. L. (2003). Regeneration of trabecular bone using porous ceramics. *Curr Opin Solid State Mater Sci* 7(4-5): pp. 301-307.
- [30] Hattori, H., Masuoka, K., Sato, M., Ishihara, M., Asazuma, T., Takase, B., Kikuchi, M., Nemoto, K. and Ishihara, M. (2006). Bone Formation Using Human Adipose Tissue-Derived Stromal Cells and a Biodegradable Scaffold. *J Biomed Mater Res* 76(1): pp. 230-239.
- [31] Li, W. J., Tuli, R., Huang, X., Laquerriere, P. and Tuan, R. S. (2005). Multilineage differentiation of human mesenchymal stem cells in a three-dimensional nanofibrous scaffold. *Biomaterials* 26(25): pp. 5 158-5 166.
- [32] Jinghuan Huang, J., Gräter, S. V., Corbellini, F., Rinck-Jahnke, S., Bock, E., Kemkner, R., Kessler, H., Ding, J. and Spatz, J. P. (2009). Impact of Order and Disorder in RGD Nanopatterns on Cell Adhesion. *Nano Lett* 9(3): pp. 1 111-1 116.
- [33] Seong, J. M., Kim, B. C., Park, J. H., Kwon, I. K., Mantalaris, A. and Hwang, Y. S. (2010). Stem cells in bone tissue engineering. *Biomedical Materials* 5(6): pp. 1-15.
- [34] Mohamadreza, B. E. and Faezeh, F. (2011). *Mesenchymal Stem Cell-Based Bone Engineering for Bone Regeneration*. Royan Institute for Stem Cell Biology and Technology. Tehran, Iran.

- [35] Mao, J. J., Giannobile, W. V., Helms, J. A., Hollister, S. J., Krebsbach, P. H., Longaker, M. T. and Shi, S. (2006). Craniofacial tissue engineering by stem cells. *J Dent Res* 85(11): pp. 966-979.
- [36] Prockop, D. J. and Olson, S. D. (2007). Clinical trials with adult stem/progenitor cells for tissue repair: let's not overlook some essential precautions. *Blood* 109(8): pp. 3 147-3 151.
- [37] Undale, A. H., Westendorf, J. J., Yaszemski, M. J. and Khosla, S. (2009). Mesenchymal Stem Cells for Bone Repair and Metabolic Bone Diseases. *Mayo Clinical Proceedings* 84(10): pp. 893-902.
- [38] Mao, J. J. and Collins, F. M. (2008). *Stem Cells: Sources, Therapies and the Dental Professional. A Peer-Reviewed Publication.* Academy of Dental Therapeutics and Stomatology.
- [39] Kadiyala, S., Young, R. G., Thiede, M. A. and Bruder, S. P. (1997). Culture expanded canine mesenchymal stem cells possess osteochon drogenic potential *in vivo* and *in vitro*. *Cell Transplant* 6(2): pp. 125-134.
- [40] Kadiyala, S., Young, R. G., Thiede, M. A. and Bruder, S. P. (1997). Culture expanded, bone marrow derived mesenchymal stem cells regenerate a critical sized segmental bone defect. *Tissue Engineering* 3(2): pp. 173-185.
- [41] Bruder, S. P., Kraus, K. H., Golderberg, V. M. and Kadiyala, S. (1998). The effect of implants loaded with autologous mesenchymal stem cells on the healing of canine segmental bone defects. *JBJS* 80(7): pp. 985-996.
- [42] Kon, E., Muraglia, A., Corsi, A., Bianco, P., Marcacci, M., Martin, I., Boyde, A., Ruspantini, I., Chistolini, P., Rocca, M., Giardino, R., Cancedda, R. and Quarto, R. (2000). Autologous bone marrow stromal cells loaded onto porous hydroxyapatite ceramic accelerate bone repair in critical-size defects of sheep long bones. *J Biomed Mater Res* 49(3): pp. 328-337.
- [43] Arinzech, T. L., Tran, T., Mcalary, J. and Daculsi, G. (2005). A comparative study of biphasic calcium phosphate ceramics for human mesenchymal stem cell induced bone formation. *Biomaterials* 26(17): pp. 3 613-3 638.
- [44] Rose, F. R., Hou, Q. and Oreffo, R. O. (2004). Delivery systems for bone growth factors- the new players in skeletal regeneration. *J Pharm Pharmacol* 56(4): pp. 415-427.
- [45] Yang, X. B., Whitaker, M. J., Sebald, W., Clarke, N., Howdle, S. M., Shakesheff, K. M. and Oreffo, R. O. C. (2004). Human osteoprogenitor bone formation using encapsulated bone morphogenetic protein 2 in porous polymer scaffolds. *Tissue Engineering* 10(7-8): pp.1 037-1 045.
- [46] Montjovent, M. C., Mathieu, L., Hinz, B., Applegate, L. L., Bourban, P. E., Zambelli, P. Y., Manson, J. A. and Pioletti, D. P. (2005). Biocompatibility of bioresorbable poly(L-lactic acid) composite scaffolds obtained by supercritical gas foaming with human fetal bone cells. *Tissue Engineering* 11(11-12): pp. 1640-1649.
- [47] Meijer, G. J., De Bruijn, J. D., Koole, R. and Van Blitterswijk, C. A. (2007). Cell bone tissue engineering. *PLoS Medicine* 4(2): pp. 0260-0264.
- [48] Arash Khojasteh, A., Eslaminejad, M. B. and Nazarian, H. (2008). Mesenchymal stem cells enhance bone regeneration in rat calvarial critical size defect more than platelet rich plasma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 106(3): pp. 356-362.
- [49] Jaffarian, M., Eslaminejad, M. B., Khojasteh, A., Mashhadi, F. A., Dehghan, M. M., Hassanizadeh, R. and Houshmand, B. (2008). Marrow derived mesenchymal stem cells directed bone regeneration in dog mandible: a comparison between biphasic calcium phosphate and natural bone mineral. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 105(5): pp. 14-24.
- [50] Diao, Y., Ma, Q., Cui, F. and Zhong, Y. (2009). Human umbilical cord mesenchymal stem cells: osteogenesis *in vivo* as seed cells for bone tissue engineering. *Journal of biomedical materials research* 91(1): pp. 123-131.
- [51] Bella, C. D. (2008). Bone regeneration in a rabbit critical sized skull defect using autologous adipose derived cells. *Tissue Engineering* 14(4): pp. 483-490.
- [52] Jang, B., Byeon, Y.-E., Lim, J.-H., Ryu, H.-H., Kim Wan, H., Koyama, Y., Kikuchi, M., Kang, K.-S., Kweon, O.-K. (2008). Implantation of canine umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells mixed with beta-tricalcium phosphate enhances osteogenesis in bone defect model dogs. *J Vet Sci* 9(4): pp. 387-393.
- [53] Ruhé, F. Q., Boerman, O. C., Russel, F. G. M., Spauwen, P. H. M., Mikos, A. G. and Jansen, J. A. (2005). Controlled release of rhBMP-2 loaded poly(dilactic-co-glycolic acid)/calcium phosphate cement composites *in vivo*. *J Control Release* 106(1-2): pp. 162-171.
- [54] Marion, N. W. and Mao, J. J. (2006). Mesenchymal stem cells and tissue engineering. *Methods Enzymol* 420: pp. 339-361.
- [55] Troken, A., Marion, N., Hollister, S. and Mao, J. (2007). Tissue engineering of the synovial joint: the role of cell density. *Proc Inst Mech Eng H*. 221(5): pp. 429-440.
- [56] Alhadlaq, A. and Mao, J. J. (2003). Tissue engineering neogenesis of human shaped mandibular condyle from rat mesenchymal stem cells. *J Dent Res* 82(12): pp. 951-956.
- [57] Alhadlaq, A. and Mao, J. J. (2005). Tissue engineering osteochondral constructs in the shape of an articular condyle. *J Bone Jt Surg AM* 87(5): pp. 936-944.
- [58] Quarto, R., Mastrogiacomo, M., Cancedda, R., Kutepov, S. M., Mukhachev, V., Lavroukov, A., Kon, E. and Marcacci, M. (2001). Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells. *National english journal of medicine* 344(5): pp. 385-386.
- [59] Gronthos, S. (2004). Reconstruction of human mandible by tissue engineering. *Lancet* 364(9436): pp. 735-736.
- [60] Morishita, T., Honoki, K., Ohgushi, H., Kotobuki, N., Matsushima, A. and Takakura, Y. (2006). Tissue engineering approach to the treatment of bone tumors: three cases of cultured bone grafts derived from patients mesenchymal stem cells. *Artificial Organs* 30(2): pp. 115-118.
- [61] Marcacci, M., Kon, E., Moukhachev, V., Lavroukov, A., Kutepov, S., Quarto, R., Mastrogiacomo, M. and Cancedda, R. (2007). Stem cells associated with macroporous bioceramics for long bone repair: 6 to 7 year outcome of a pilot clinical study. *Tissue Engineering* 13(5): pp. 947-955.
- [62] Kaigler, D., Wang, Z., Horger, K., Mooney, D. J. and Krebsbach, P. H. (2006). VEGF scaffolds enhance angiogenesis and bone regeneration in irradiated osseous defects. *J Bone Miner Res* 21(5): pp. 735-744.
- [63] Chu, T. M., Warden, S. J., Turner, C. H. and Stewart, R. L. (2007). Segmental bone regeneration using a load bearing biodegradable carrier of bone morphogenetic protein-2. *Biomaterials* 28(3): pp. 459-467.
- [64] Geiger, F., Bertram, H., Berger, I., Lorenz, H., Wall, E., Eckhardt, C., Simank, H. G. and Richter, W. (2005). Vascular endothelial growth factor gene activated matrix (VEGF165-GAM) enhances osteogenesis and angiogenesis in large segmental bone defects. *J Bone Miner Res* 20(71): pp. 2 028-2 035.

- [65] Peng, H., Usas, A., Olshanski, A., Ho, A. M., Gearhart, B., Cooper, G. M. and Huard, J. (2005). VEGF improves, whereas sFlt1 inhibits, BMP2 induced bone formation and bone healing through modulation of angiogenesis. *J Bone Miner Res* 20(11): pp. 2 017-2 027.
- [66] De Nihouannen, L., Daculsi, G., Saffarzadeh, A., Gauthier, O., Delplace, S., Pilet, P. and Layrolle, P. (2005). Ectopic bone formation by microporous calcium phosphate ceramic particles in sheep muscles. *Bone* 36(6): pp. 1 086-1 093.
- [67] De Nihouannen, L., Duval, L., Lecomte, A., Julien, M., Guilleux J., Daculsi, G. and Layrolle, P. (2007). Interactions of total bone marrow cells with increasing quantities of macroporous calcium phosphate ceramic granules. *J Mater Sci Mater Med* 18(10): pp. 1 983-1 990.
- [68] Fellah, B. H., Gauthier, O., Weiss, P., Chappard, D. and Layrolle, P. (2007). A long term evaluation of osteoinductive HA/beta-TCP ceramics *in vivo*: 4,5 years study in pigs. *J Mater Sci Mater Med* 18(11): pp. 2 173-2 178.
- [69] Fellah, B. H., Gauthier, O., Weiss, P., Chappard, D. and Layrolle, P. (2008). Osteogenicity of biphasic calcium phosphate ceramics and bone autograft in a goat model. *Biomaterials* 29(9): pp.1 177-1 188.
- [70] Yang, R. N., Ye, F., Cheng, L. J., Wang, J. J., Lu, X. F., Shi, Y. J., Fan, H. S., Zhang, X. D. and Bu, H. (2011). Osteoinduction by Ca-P biomaterials implanted into the muscles of mice. *J Zhejiang Univ Sci B*.12(7): pp. 582-590.