

## CONTENIDO:

### INTRODUCCIÓN

LA RESORCIÓN ÓSEA	4
La resorción alveolar	5
Características de la resorción alveolar	6
La periodontitis asociada a la resorción alveolar	7
La extracción dentaria asociada a la resorción alveolar	8
CAMBIOS FISIOLÓGICOS Y CICATRIZACIÓN DEL ALVEOLO DESPUÉS DE LA EXTRACCIÓN	9
Preservación del hueso alveolar	12
LAS CÉLULAS MADRE	15
Las células madre mesenquimales	16
Células madre mesenquimales del tejido adiposo	18
IMPORTANCIA EN LA APLICACIÓN ODONTOLÓGICA	20
DISEÑO METODOLÓGICO	22
• Hipótesis:	
• Objetivos:	
• Material y métodos:	
• Cultivo primario	
• Cultivo secundario: desprendimiento y subcultivo de CMMTA autólogo	
• Extracción dental y colocación de CMMTA en sedimento en los alveolos	
• Fijación y preparación de las muestras	
• Deshidratación e inclusión	
RESULTADOS	26
LECCIONES APRENDIDAS	30
CONCLUSIONES	31
AGRADECIMIENTO	32
BIBLIOGRAFÍA	33

## INTRODUCCIÓN

En España la media de dientes ausentes en la población de 35-44 años es de 1.40 y en la población de 65-74 años con al menos 21 dientes funcionales asciende a 44.3%, siendo un problema generalizado, inclusive en muchos países de Latinoamérica como Perú, donde cerca de medio millón de dientes se extraen anualmente (Llodra, 2012)

La resorción ósea alveolar tiene varias causas: la extracción dental, trauma, periodontitis moderada a severa y fuerza continua en el tratamiento ortodóntico. Todo ello conlleva a un posible fracaso de la prótesis e implante dental y un desequilibrio en la oclusión y la salud bucal, alterando inclusive la autoestima de las personas.

Diversas investigaciones (Meruane y Rojas; 2010) han demostrado que las células madre mesenquimales del tejido adiposo (CMMTA) desempeñan un papel relevante en la reparación ósea, sin embargo, no hay suficiente evidencia sobre sus efectos en el hueso alveolar después de la extracción dentaria.

En este trabajo he desarrollado un modelo experimental en rata para observar los posibles efectos de las CMMTA en el alveolo después de la extracción dental.

## LA RESORCIÓN ÓSEA

Es el proceso en el cual los osteoclastos eliminan tejido óseo liberando minerales que desencadenan una transferencia de calcio desde la matriz ósea a la sangre. El mecanismo de resorción ósea consiste en que la anhidrasa carbónica cataliza la síntesis de ácido carbónico. Este ácido se disocia en hidrogeniones ( $H^+$ ) e iones de bicarbonato, estos iones de bicarbonato y sodio salen del osteoclasto y pasan a los capilares. Las bombas de protones sacan a los hidrogeniones al compartimento subosteoclástico (laguna de Howship), el pH disminuye y se disuelve el componente inorgánico de la matriz, los osteoclastos secretan hidrolasas lisosómicas y metaloproteínas hacia el compartimento subosteoclástico con el fin de degradar los componentes orgánicos, los osteoclastos endocitan los productos de degradación y los liberan hacia los capilares (Lecuona et al, 2015).

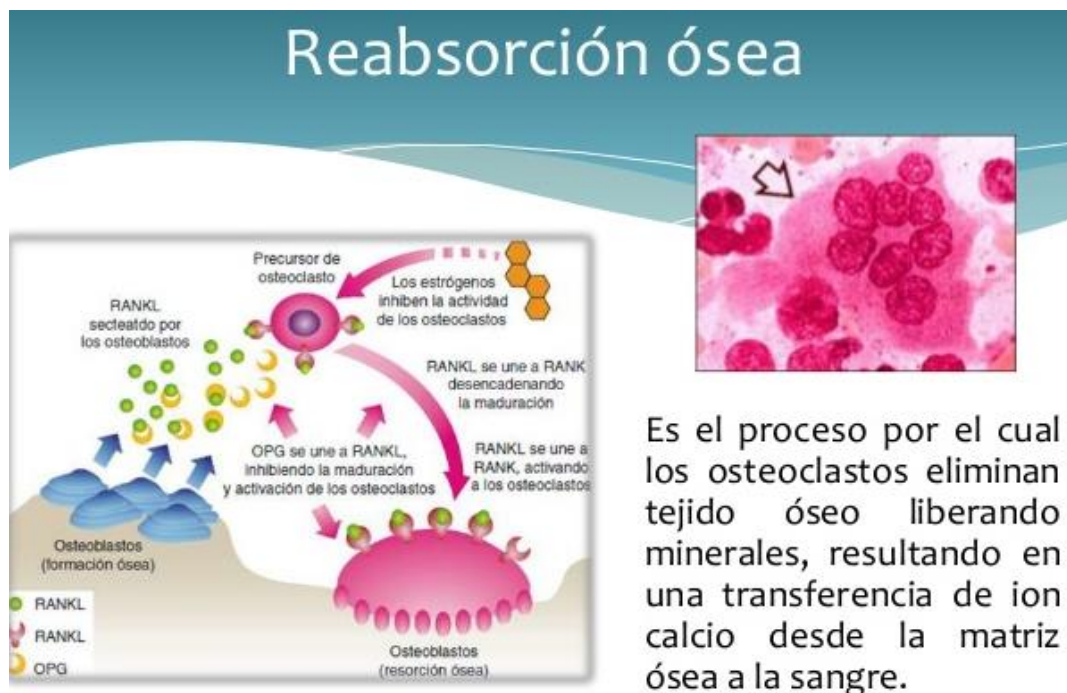


Fig. N° 01: Mecanismo de resorción y remodelación ósea

El tejido óseo es dinámico, tiene la capacidad de remodelar el hueso a lo largo de una vida. La remodelación es un proceso de regulación de la calcemia, en el cual el hueso recién formado o envejecido es sustituido por nuevo hueso, siendo ese su objetivo principal. Para ello debe existir un equilibrio, dependiendo de los osteoblastos y osteoclastos que trabajan como una unidad para reemplazar tejido óseo.

Los osteoclastos, son células multinucleadas especializadas para llevar a cabo la resorción ósea fisiológica y la osteolisis. La osteolisis es característica de la mayoría de las enfermedades de hueso y articulaciones. También juega un papel patológico en la resorción ósea, en la medida que se alteran los mecanismos celulares y moleculares que gobiernan su formación y función (Athanasou; 2011), (Lecuona et al, 2015).

La resorción de un sistema de Havers antiguo se continúa con la formación de uno nuevo, para ello se reclutan monocitos, que se diferencian a osteoclastos, éstos comienzan la resorción ósea y una vez que los osteoclastos terminan de eliminar la zona de hueso correspondiente, aparecen los osteoblastos que sintetizan matriz orgánica, sobre la que se van depositando nuevas laminillas óseas. Una vez que los osteoblastos cumplen su función quedan rodeados por matriz ósea mineralizada para convertirse en osteocito que ocupan sus respectivas lagunas (Lecuona et al, 2015)

### La resorción alveolar

En el hueso trabecular el mecanismo de reparación y resorción es parecido al hueso cortical y ocurre en la superficie ósea, incluyendo la superficie endóstica de las trabéculas (Lecuona et al, 2015). Sin embargo, en todos los casos hay una resorción alveolar después de la extracción dentaria, posiblemente debido a la ausencia de tejido periodontal, pulpa dental y el mismo diente. Por lo que los osteoclastos van liberando los minerales hacia los capilares en el proceso de cicatrización alveolar y después de la extracción dental la homeostasis entre osteoclastos y osteoblastos se modifica.

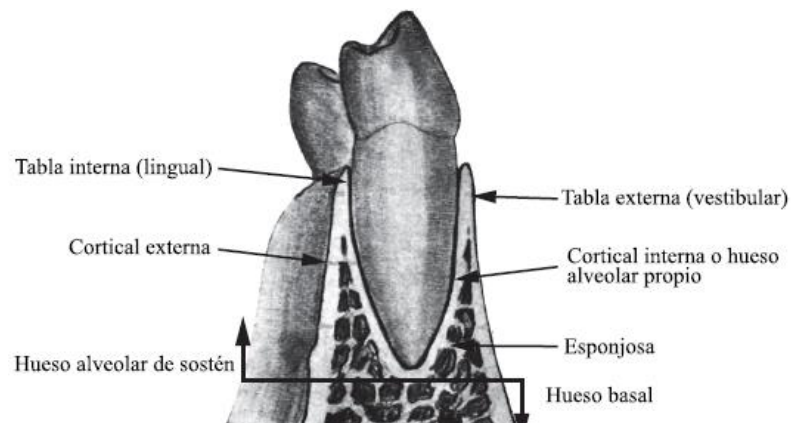


Fig. N° 02: Hueso alveolar. Plano frontal.

### Características de la resorción alveolar

Durante las primeras 8 semanas después de la extracción se produce alteraciones dimensionales marcadas por la actividad osteoclástica, resultando una resorción de la pared ósea bucal y lingual, acompañada por una pérdida horizontal del alveolo. Estudios de Araujo y Lindhe, (2005) sugieren que la resorción de las paredes en el sitio de la extracción se produce en 2 fases. En la primera se produce una resorción del hueso alveolar y se sustituye por tejido óseo, sin embargo ocurre una mayor reducción sustancial de la cresta bucal en sentido vertical que lingual. En la segunda fase la resorción se produce a partir de las superficies exteriores de ambas paredes óseas.

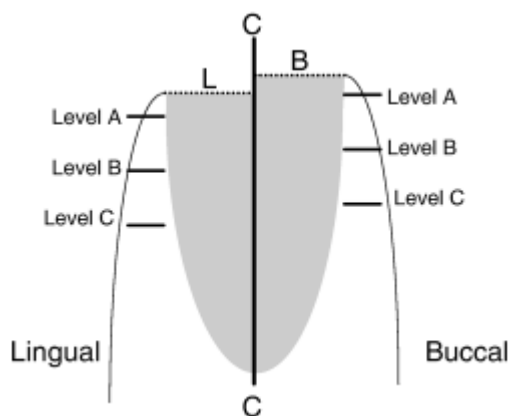


Figura N° 03: Esquema de las zonas de corte y mediciones histométricas. Creados por Araujo y Lindhe, (2005).

Una investigación sobre las características estructurales y funcionales de los osteoclastos apoptóticos en hueso alveolar de ratas tratadas con estrógeno, sugiere que la apoptosis de los osteoclastos implica actividad caspasa-3 y la degradación de la vimentina. Estos osteoclastos al entrar en apoptosis condensan sus núcleos que posteriormente se fragmentan y se liberan en porciones rodeadas de membranas conocidas como cuerpos apoptóticos. La reducción de la superficie del hueso/osteoclastos parece estar relacionado con el desarreglo de vimentina, en lugar de una interferencia del estrógeno con expresión de MMP-9 en los osteoclastos (Faloni et. al; 2012).

### La periodontitis asociada a la resorción alveolar



Fig. N° 04: Proceso de la enfermedad periodontal. Figura tomada de la Clínica Dental Pons Fuster.

La *Porphyromonas gingivalis* (Pg) provoca resorción ósea alveolar, se trata de un patógeno periodontal importante que contiene una variedad de factores de virulencia contribuyendo a la osteoclastogénesis de las células del ligamento periodontal, resultando la enfermedad periodontal y la reabsorción del hueso alveolar (Al Batran et al; 2013) (Lin et al; 2014).

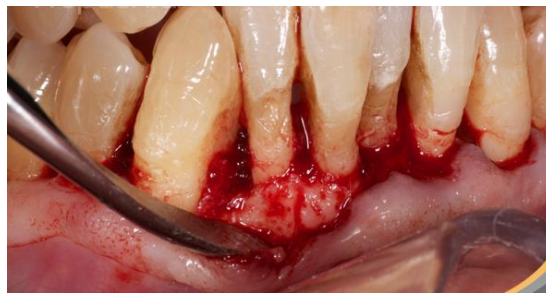


Fig. N° 05: Enfermedad periodontal. Tomado de la Clínica Propdental.

### La extracción dentaria asociada a la resorción alveolar



Fig. N° 06: Causas de Extracción dentaria. Tomado de la Clínica Dentadent.

La extracción dentaria es la remoción del diente del hueso alveolar; se trata de un procedimiento odontológico indicado en casos de:

- caries avanzada donde no es posible la aplicación de la odontología conservadora,
- anomalías de posición,
- piezas dentarias con fracturas y fisuras coronarias sublinguales,
- periodontitis agresiva y avanzada con grados de movilidad no estables y no recuperables y progresivos,
- piezas con problemas focales que diseminan bacterias que no se pueden solucionar con tratamientos endodónticos,
- piezas temporales que impiden la erupción de una pieza permanente,
- tratamientos ortodónticos en los que hay una gran discrepancia óseo dentaria, sin posibilidad de crecimiento óseo,
- caries radiculares muy subgingivales y sobre todo subóseas,
- piezas retenidas, impactadas e incluídas
- piezas que tengan patología quística o posibles reabsorciones radiculares,
- desequilibrio de las arcadas o problemas tumorales.

Los alveolos dentales son los compartimentos, en los que están divididos el hueso alveolar, donde van alojados los dientes separados por un tabique interseccional óseo.

Fig. N° 07: Alveolo en el proceso de extracción dental



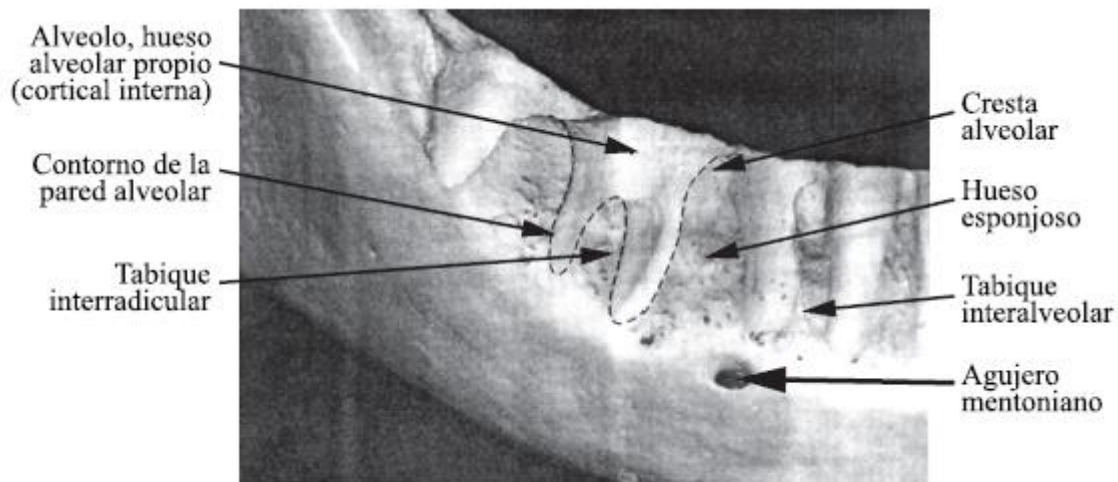


Fig. N° 07 A: Alveolo dental. Tomado del Blog la importancia de los dientes.

### **CAMBIOS FISIOLÓGICOS Y CICATRIZACIÓN DEL ALVEOLO DESPUÉS DE LA EXTRACCIÓN**

Después de la extracción dental se desencadenan cambios fisiológicos en un proceso de puente de tejido duro a la formación de hueso cortical que cierra el alveolo dental. Todo implica una serie de eventos, incluyendo la formación de un coágulo a los 3 días que se sustituye a los 14 días por una matriz provisional de tejido conectivo. Este tejido conjuntivo es sustituido por tejido óseo, y finalmente a los 30 días hay hueso mineralizado que ocupa el 88% del alveolo. A los 60 días el alveolo está ocupado en un 75% por médula ósea (BM) (Cardaropoli, G. et al; 2003).

Según Amler; (1969) existen 5 estadios de cicatrización de un alveolo después de la extracción:

- El primer estadio se forma un coágulo produciéndose la hemostasia.
- El segundo, sobre el 4° o 5° día el tejido de granulación reemplaza al coágulo y se inicia la angiogénesis a través de la cadena de células endoteliales y la formación de capilares.
- El tercero, sobre el 14-16 días el tejido conectivo reemplaza gradualmente al tejido de granulación y hay un recubrimiento epitelial completo.



- El cuarto estadio inicia la calcificación del tejido osteoide, comenzando en la base y periferia del alveolo (7-10 días) y a las 6 semanas el hueso trabecular rellena casi por completo al alveolo. Hay una máxima actividad osteoblástica, proliferación de elementos celulares y de tejido conectivo con osteoblastos debajo de tejido osteoide alrededor de lagunas inmaduras de hueso (4-6 semana post extracción). Tras la 8ª semana la osteogénesis parece disminuir.
- En quinto estadio, tras la 4º o 5º semana hay epitelización completa del alveolo, se produce un relleno completo entre la 5º y 10º semana y a las 16 semanas se completa el relleno óseo con poca actividad osteogénica.



Fig. N° 08: Reborde dentario. Tomado de la Revista de operatoria Dental.

En caso de los tejidos blandos, observaciones histológicas e histoquímicas en biopsias señalan que durante los primeros 10 días después de la extracción, los tejidos de individuos más jóvenes y de mayores sanan a la misma velocidad; pero, después de los 10 días post-extracción, los tejidos más jóvenes continúan una curación progresiva, mientras que los tejidos de los mayores mantienen una fase de reposo, llegando a tener un ciclo de crecimiento acelerado a las tres semanas, y en 30 a 40 días igualan el patrón de cicatrización al de los tejidos jóvenes (Amler; 1993)

Sin embargo, Seibert (1983) señala que los defectos de los alveolos después de la extracción pueden ser:

- Clase I; son pérdidas vestíbulo linguales o palatinos y tienen una altura normal en sentido apicocoronales
- Clase II; son pérdidas apicocoronales pero tienen una dimensión normal en sentido bucolinguales
- Clase III; son pérdidas vestíbulo linguales o palatinos y apicocoronales con disminución de altura y anchura.

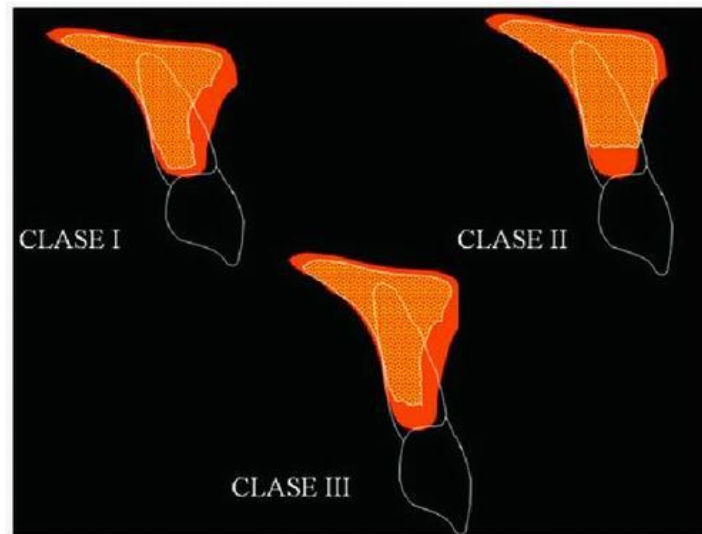
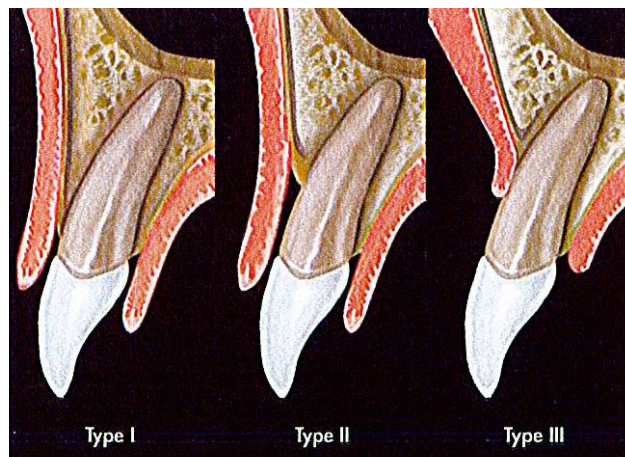


Fig. N° 09: Clasificación de Seibert.

Elián et al; (2007) plantea una clasificación de defectos óseos en 3 tipos:

- Tipo I; tejidos blandos y pared ósea bucal a nivel del límite amelo cementaria (LAC) previo a la extracción y después a la extracción, es fácil de tratar y tiene resultados predecibles.
- Tipo II; tejidos blandos bucales en posición normal pero hay pérdida parcial de la tabla ósea vestibular después de la extracción. Se confunde con el tipo I.
- Tipo III; pérdida de tabla ósea y de tejidos blandos en vestibular después de la extracción, es difícil de tratar. Siendo imprescindible preservar el alveolo para evaluar la

colocar



posibilidad de un implante inmediato.

Fig. N° 10: Clasificación de defectos óseos propuesto por Elián y colaboradores.

Según Araujo et al; (2005) después de 3 meses de la extracción dental ocurren alteraciones dimensionales marcadas en el reborde desdentado y debiera considerarse la colocación de implantes inmediatamente después de la extracción dental, ya que la pérdida ósea vertical es más pronunciada en bucal que lingual de la cresta.

Por otro lado Araújo y Lindhe; (.2009) con sus hallazgos sugieren que cantidades similares de pérdida de tejido duro se producen durante la curación independientemente si el procedimiento utilizado para extraer el diente fue sin colgajo o con colgajo.

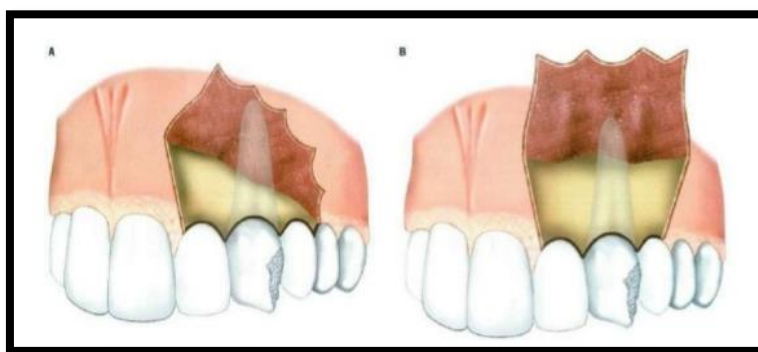


Fig. N° 11: Colgajos gingivales con una y dos descargas.

### **Preservación del hueso alveolar**

El impacto positivo de la calidad y cantidad de hueso formado en los alvéolos después de la extracción del diente, es vital para el éxito del tratamiento posterior. Por lo tanto, el establecimiento de un nuevo enfoque para mejorar la formación de hueso y para minimizar la resorción ósea es importante (Kuroshima et al; 2013).

A continuación se describe estudios que intentan prevenir la resorción ósea tempranamente en un modelo animal:

- Normalmente la extracción de dientes en pacientes conduce a la pérdida de la anchura y la altura de la cresta alveolar. Preservar esta zona es importante para la colocación de implantes. Para tal fin se han utilizado aloinjertos de hueso liofilizado FDBA y una membrana de colágeno mejorando ligeramente los sitios de conservación (Iasella et al; 2003).

- Se ha evaluado la eficacia terapéutica de hueso mineral sintético (SBM) para minimizar la pérdida de hueso alveolar. Mijares et al; (2012) sugieren que el SBM administrado por vía oral, puede ser un agente potencial terapéutico en la osteoporosis minimizando o previniendo la pérdida de hueso alveolar inducida por deficiencia de minerales.
- Los hallazgos sobre la preservación de las paredes alveolares revelan que la incorporación de biomateriales como BioOss colágeno tras la extracción sólo tiene un impacto limitado en el proceso biológico posterior, respecto a la pared ósea vestibular que fue sustituida por hueso guiado recién generado. Al parecer la estabilidad mecánica proporcionada por BioOss colágeno y además por un injerto gingival libre podría actuar como un marcador de posición al prevenir que el tejido blando se colapse (Fickl et. al; 2008).
- En el campo clínico el uso de hueso autógeno de la mandíbula como el material de injerto, es el estándar de oro; sin embargo, hay algunos problemas con esta técnica, como el riesgo de infección en el lado donante, la limitada cantidad de masa ósea disponible y la marcada reabsorción del hueso injertado (Nampo et al; 2010).
- Se investigó también el uso potencial de los dientes como un material de injerto óseo para la formación de hueso mandibular, debido a que la pulpa dental contiene células madre, incluyendo células derivadas de la cresta neural no diferenciadas. Hay resultados que sugieren que los dientes pueden ser un material alternativo para hueso autógeno para el tratamiento de defectos óseos alveolares por injerto (Nampo et al; 2010)

- El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) es una macromolécula de importancia en la inflamación que se ha implicado en la periodontitis. Datos actuales sugieren un papel importante para VEGF en la progresión de la enfermedad periodontal y que la terapia sistémica con meloxicam puede modificar la progresión de la periodontitis inducida experimentalmente en ratas mediante la reducción de la expresión de VEGF y la pérdida de hueso alveolar (Oliveira et al; 2008)
- Estudios con bajas dosis de doxiciclina sugieren que reduce el área de resorción del hueso alveolar asociado con periodontitis apical en los primeros molares mandibulares en un modelo en ratas (Metzger et al; 2008)
- Sin embargo hay hallazgos de que la histamina liberada durante la inflamación desempeña un papel en el metabolismo óseo a través del receptor H<sub>2</sub>, estimulando la resorción ósea. Por su parte, (Longlini R. et al; 2014) han evaluado si la cimetidina, un antagonista del receptor H<sub>2</sub> de la histamina, interfiere con la iniciación y progresión de la enfermedad periodontal. Sus hallazgos sugieren que ejerce un efecto beneficioso sobre la enfermedad periodontal en ratas, disminuyendo la relación RANKL/ OPG en el tejido conjuntivo gingival y reduciendo la resorción del hueso alveolar.
- En un modelo animal de enfermedad periodontal sobre el efecto del propranolol. Se sugiere que las dosis bajas de propranolol suprimen la resorción de hueso mediante la inhibición de la osteoclastogénesis mediada por RANKL, y la disminución de marcadores inflamatorios, sin afectar a los parámetros hemodinámicos (Rodríguez et al; 2012).
- Otros hallazgos demuestran que la simvastatina tiene el potencial de estimular la función osteoblástica y que la administración tópica de la simvastatina puede ser eficaz para la recuperación de pérdida ósea alveolar en ratas (Seto et al; 2008).

- Un estudio sobre la calidad de hueso alveolar en ratas hipertensas muestra que presentan alteraciones en la calidad de hueso de soporte, independientemente de la inflamación, y sugieren que la administración de lercanidipino durante 45 días disminuye la expresión de marcadores de resorción de hueso (Bastos M. et al; 2010).
- El valor medio más alto de la formación de hueso e inhibición de la resorción ósea producida en el proceso de curación alveolar después de la extracción dental se han logrado en las ratas hembras tratadas con oxitocina (OT) (Colli et al; 2012).
- Un estudio sobre el efecto de la terapia intermitente de hormona paratiroidea (PTH) injertada con xenoinjerto después de extracciones dentarias sugieren una mejora significativa del alveolo dental, pudiendo ser un gran activo para la conservación de la cresta alveolar. Sin embargo, la fuente del material de injerto se transfiere de un donante, y debe ser procesada adecuadamente, principalmente se trata de hueso mineral poroso de bovino desproteinizado (Kuroshima et al; 2013); (Iñakis ;2006)
- Según Fukuoka et al; (2011) la irradiación con láser de dióxido de carbono en terapias con alto y bajo nivel de reactividad (HLLT y TLBI respectivamente) en los alvéolos después de la extracción dental, han mostrado un efecto curativo favorable, pero con diferentes características en el proceso de cicatrización.
- Por medio de la micro-tomografía computarizada (micro-CT) y la histología se han verificado el efecto de la aplicación tópica del factor de crecimiento nervioso (NGF) y / o el factor de crecimiento epidérmico (EGF), en la mejora periodontal, el hueso alveolar, la raíz y la reparación del tejido pulpar, reduciendo al mínimo el riesgo de necrosis pulpar, reabsorción radicular y anquilosis de molares en un modelo experimental en rata. Los hallazgos revelan que no se detectó ningún beneficio potencial en la curación periodontal y la raíz, solo una mejora en la vascularización pulpar y organización celular al incorporarse en el alveolo dental (Furfaro et al; 2014).

- Estudios de Nakatsuka et al; (2014) sugieren también que el efecto del extracto de frijol de espada (*Canavalia brasiliensis*) (SBE) podría ser eficaz contra *P. gingivalis* asociada a la resorción de hueso alveolar.

## LAS CÉLULAS MADRE

También son conocidas como células troncales (Stem Cells). Estas células se encuentran en organismos multicelulares, tienen la capacidad de dividirse a través de mitosis, diferenciarse en varios tipos de células especializadas y auto renovarse en otras células madre. Tienen la capacidad de dividirse asimétricamente dando origen a 2 células hijas; una con unas propiedades idénticas a la madre original y la otra con capacidades de diferenciarse si existen condiciones ambientales adecuadas. Los organismos adultos poseen células madres residentes que permiten su renovación o regeneración cuando ocurre el daño tisular (Orozco; 2010).

Los tipos de células madre disponibles son:

- *Células madres embrionarias*; son pluripotentes y pueden dar origen a 3 capas germinales: ectodermo, mesodermo y endodermo, manteniéndose de forma indefinida y diferenciándose a su vez (Orozco N.; 2010). El potencial terapéutico de estas células, aunque parece enorme debido a su gran capacidad de renovación y pluripotencialidad, tiene limitaciones prácticas y éticas en su utilización (Meruane y Rojas 2010)
- *Células madres adultas multipotenciales*; se les denomina células madre mesenquimales y son capaces de diferenciarse en células madres mesenquimales o hematopoyéticas mientras que otras son precursoras directas del tejido en que se encuentran (Orozco; 2010).

## **Las células madre mesenquimales**

Se las considera multipotenciales con autorenovación limitada y con capacidad de dar origen a tejidos de la misma capa embrionaria. Sin embargo, numerosas publicaciones actuales muestran su diferenciación a tejidos de otro origen embrionario, por lo que estas células podrían pasar a la categoría de pluripotenciales (Meruane y Rojas; 2010).

Las células madre mesenquimales (MSC) son de gran interés para la reparación ósea en diversas disciplinas de las ciencias de la salud, inclusive la odontología por lo que manipular las MSC in vitro es clave para potenciar un beneficio terapéutico. Se ha demostrado que estas células madres multipotentes se pueden aislar a partir de tejidos como la médula ósea, tejido adiposo, tejido amniótico, la sangre del cordón umbilical, y los dientes deciduos. Estas células mesenquimales se pueden cultivar logrando buena adherencia y mostrando la capacidad de diferenciarse en células de los linajes del tejido conectivo y contribuir al parénquima de tejido in vivo (Odabas et al; 2014).

Por tanto, las MSC exploradas en el campo de la odontología podría mejorar la calidad de vida de los pacientes desde enfermedades traumáticas hasta reemplazo de estructuras más complejas, como los huesos y los dientes, inclusive podría restaurar la función de órganos completos (Fawzy El-Sayed et al; 2013).

En el campo de la reparación periodontal y la ingeniería de los dientes, están siendo investigados varios tipos de células madre mesenquimales adultas multipotentes (MSC) a partir de diversas fuentes como de la médula ósea, tejido adiposo, pulpa dental, folículo dental, dientes deciduos exfoliados, papila dental, ligamento periodontal, hueso alveolar y de la encía, pero todavía el uso potencial para fines reparativos en el campo dental se discute (Fawzy El-Sayed KM et al; 2013).

Según Meruane y Rojas; (2010) las células madre adultas tienen la ventaja de ser obtenidas de individuos adultos sin los problemas éticos que trae el uso de células embrionarias. Su obtención ha sido una revolución ya que estas células pueden ser obtenidas en grandes cantidades, con mínimo discomfort y hasta con anestesia local. Si comparamos las células madre mesenquimales del tejido adiposo (ASCs) versus las



células madre derivadas de la médula ósea (BM-MSCs) sus características fenotípicas y el potencial de diferenciación son muy similares. Actualmente se conoce la presencia de células madres mesenquimales en varios tejidos, presentes ahí con el fin de mantener y reparar (Young et al., 2002).

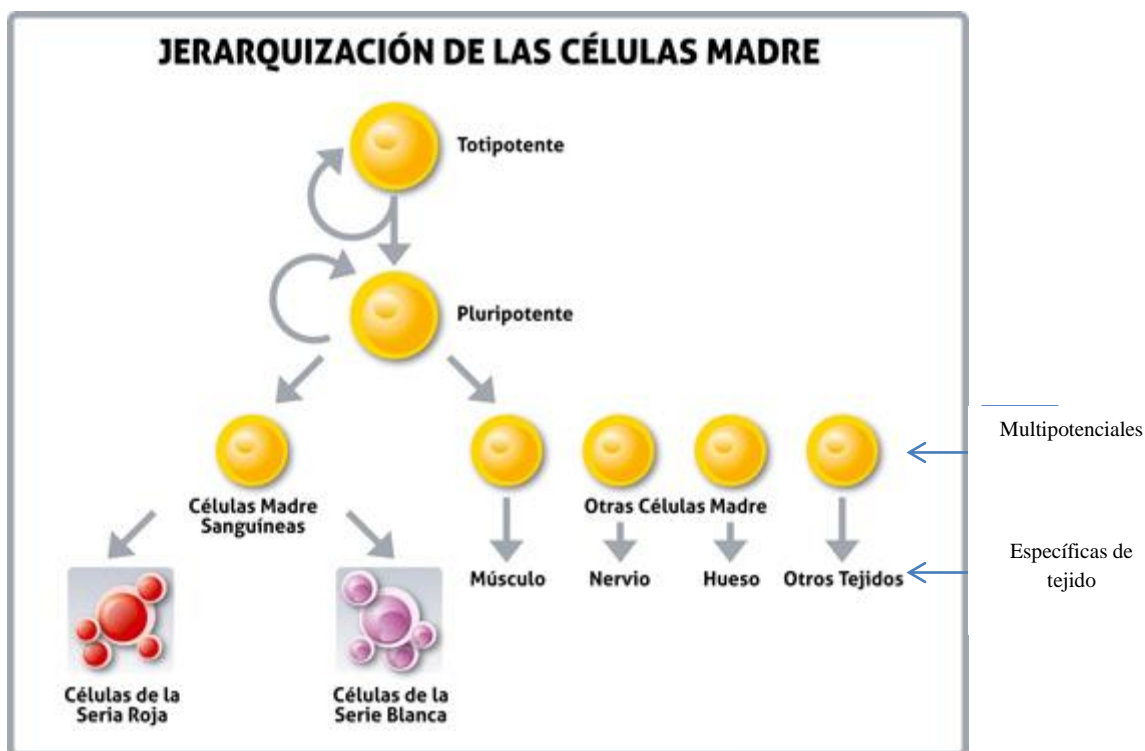


Fig. N° 12: Jerarquización de tipos de células madre. Tomado de la Clínica Genecell International.

### **Células madre mesenquimales del tejido adiposo**

El tejido adiposo posee la habilidad de cambiar de volumen durante la vida de un individuo, los cambios menores son por hipertrofia celular, pero los cambios mayores son mediados por hiperplasia y aumento de la vascularización. Estos cambios están mediados por una población de células madres multipotentes con propiedades similares a las obtenidas desde la médula ósea (Fraser et al., 2006).

Según Gimble et al.; 2007 para que las células madres puedan ser utilizadas con fines médicos deben cumplir con los siguientes criterios:

1. Presencia en cantidades muy abundantes (millones de células)
2. Aislables con procedimientos mínimamente invasivos.
3. Diferenciables en múltiples linajes celulares de manera regulable y reproducible.
4. Transplantables en forma autólogo o alogénica.
5. Manipulables de acuerdo a las actuales Guías de Buena Práctica Médica

Se prefiere las ASCs porque cumplen los criterios mencionados y considerando la incidencia de obesidad en la población actual, esta es una fuente realmente abundante y accesible. El tejido adiposo puede ser obtenido mediante lipoaspiración en grandes cantidades y con riesgo mínimo. La lipoaspiración es el 3° procedimiento que con mayor frecuencia realizan los cirujanos plásticos en Norteamérica (ASPS 2007). Según datos desde 1994 al año 2000 se han reportado 0 muertes en 66.570 procedimientos y complicaciones serias en el 0,68 por 1000 casos (Housman T. et al., 2002). Con anestesia local se pueden obtener hasta 200 gramos de tejido. 1 gramo de tejido adiposo contiene alrededor de  $5 \times 10^3$  ASCs, aproximadamente 500 veces más que 1 gramo de medula ósea (Fraser et al.; 2006).

El tejido adiposo deriva de la capa mesodérmica del embrión y tiene desarrollo pre y post natal. La formación de células adiposas en la especie humana tiene lugar durante el segundo trimestre de gestación (Ailhaud & Grimaldi; 1992). Se caracterizan por su aspecto fibroblástico que contiene abundante retículo endoplasmático, un alto índice núcleo/citoplasma, localización perinuclear de las mitocondrias y la presencia de vacuolas lipídicas (Gimble et al.; 2007).

Según Ailhaud y Grimaldi; (1992) la diferenciación celular del tejido adiposo procede de la secuencia adipoblasto-preadipocito-adipocito inmaduro-adipocito maduro. En el tejido adiposo los precursores coexisten en conjunto con células adiposas maduras, fibroblastos, células sanguíneas, células endoteliales, pericitos y células mesenquimales indiferenciadas y pobremente diferenciadas, que hoy llamamos Mesenchymal Stem Cells (MSCs) y según Hausman y Hausman, (2006) probablemente el progenitor de los adipocitos procede de la medula ósea y ha llegado a través de la circulación sanguínea.

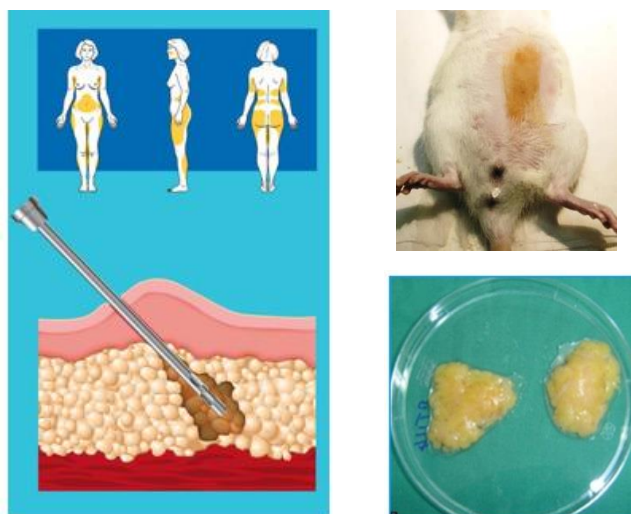


Fig. N° 13: Localizaciones frecuentes de extracción de la grasa en humano y en un modelo animal.

### IMPORTANCIA EN LA APLICACIÓN ODONTOLÓGICA

En España la población está envejeciendo con diversos problemas de salud bucal, especialmente con necesidades de rehabilitación dental. La media de dientes ausentes en la población de 35-44 años es de 1.40 y en la población de 65-74 años de edad, con al menos 21 dientes funcionales asciende a 44.3%, porcentaje de desdentados en este mismo rango de edad es del 16.7% (Llodra Calvo; 2012).

El 11% de los adultos jóvenes presentan bolsas periodontales poco profundas, y el 5% bolsas profundas. Para la población adulta mayor de 65-74 años las cifras son del 18,8% y del 10,4%, respectivamente. Para este último grupo de 65-74 años, el 41% requiere algún tipo de prótesis superior y el 46% requiere algún tipo de prótesis inferior. Con necesidades detectadas de prótesis multiunitarias (en torno al 20%). Tan sólo el 9% de este grupo requiere de tratamiento de prótesis completa (Llodra; 2012).

Actualmente, los pacientes que acuden a la consulta solicitan implantes dentales o prótesis implantosoportadas, muchos necesitan extracciones dentarias y si no se cumple las condiciones de conservación del alveolo después de la extracción dental, la cresta alveolar disminuye en volumen y cambia morfológicamente. Estos cambios pueden ser significativos clínicamente y pueden generar también fracasos en tratamientos de un puente convencional o una corona implanto soportada.

Al ser la resorción ósea lo suficientemente significativa la colocación de un implante puede llegar a ser extremadamente difícil. El mantener o preservar la cresta alveolar después de la extracción dental minimiza la resorción del reborde residual y, por lo tanto, permite la colocación de un implante que satisface criterios estéticos y funcionales. Los nuevos avances en biomateriales y técnicas de injerto permiten al odontólogo colocar implantes en sitios comprometidos. A este éxito no existen estudios de supervivencia de los tratamientos a largo plazo, pero sí de supervivencia clínica a corto plazo (Iriñakis; 2006); (Chen et al; 2004).

Según Chen et al; (2004) la supervivencia y éxito clínico asociado con la colocación del implante inmediato y retardado, producen defectos periimplantitis y reabsorción horizontal del alveolo de unos 2 mm, independientemente del protocolo de la curación del alveolo y el método de aumento óseo.

Según Cuogli et al; (2014) ocurre una reabsorción radicular en el movimiento dental. Sus hallazgos concluyen que la raíz intermedia presenta un mayor porcentaje de reabsorción ósea en comparación con la raíz mesiovestibular, principalmente después de la aplicación de la fuerza continuada. Entre los diferentes tipos de fuerzas que se aplican en el movimiento dental ninguno descarta la posibilidad de reabsorción radicular.

Según Aguirre et al; (2012) las altas dosis oncológicas de ácido zoledrónico exacerbaban la respuesta inflamatoria y el daño al periodonto causa necrosis, osteolisis y una apariencia de panal del hueso alveolar con presencia de colonias bacterianas y la destrucción del tejido periodontal.

Según Cruz et al; (2015) las células madre mesenquimales con injerto podrían mejorar la rehabilitación protésica o mejorar los protocolos de colocación de implantes dentales.

Por todo lo anterior expuesto, son limitadas las publicaciones sobre el efecto de las células madre mesenquimales del tejido adiposo en suspensión colocadas en el alveolo dental, para la investigación odontológica en la preservación del hueso alveolar.

## **DISEÑO METODOLÓGICO**

### **Hipótesis:**

- Las células madre mesenquimales del tejido adiposo en suspensión ejercen una inducción y maduración, positiva en el proceso de cicatrización y reparación alveolar después de la extracción

### **Objetivos:**

- Estudiar la reparación alveolar de una rata Wister después de la extracción de dos muelas sin tratamiento posterior. Considerado animal control
- Realizar un estudio similar en un rata que recibió en el alveolo quirúrgico derecho 300 mil CMMTA y en el izquierdo 200 mil CMMTA
- Comparar mediante cortes seriados de los maxilares, la formación de hueso en los alveolos tratados y el control.

### **Material y métodos:**

La investigación se desarrolló en el laboratorio del Departamento de Biología Celular, Histología y Farmacología de la Universidad de Valladolid (UVA) Se trata de un estudio experimental con una población y muestra de 2 ratas albinas Wister, masculinas jóvenes de 3 meses de edad, de 250-290 gramos intervenidas según el Comité Ético de la Universidad de Valladolid, de acuerdo a la normativa vigente del Consejo Europeo (2010/63/EU) y del Estado Español R.D. 1201/2005. Las ratas proceden del animalario de la UVA, mantenidas a 22 °C, con una humedad de 28-30 %, con 8 horas de luz y de oscuridad por ciclo. Se empleó una n = 1 animal como control y n = 1 como animal experimental.

### **Cultivo primario**

Una rata de 280 g de peso y 3 meses de edad fue anestesiada con Ketamina y Xylacina mediante inyección intraperitoneal. Se realizó una incisión en la piel de la región inguinal de unos 2 cm. 1 g de tejido adiposo fue cuidadosamente disecado y extraído en condiciones asépticas y llevado a una placa de cultivo que contiene medio de Leibovitz con antibiótico-antimicótico al 1%. Se retiraron los restos de sangre que quedaron en el tejido adiposo, y se troceó en partes pequeñas y se llevó a una placa con el mismo medio. Para la digestión enzimática se dejaron los restos en un matraz con 5 ml de Leibovitz y colagenasa tipo I al 0.075 % a T ambiente con agitación magnética durante 60 minutos. Esta mezcla se pasó por un filtro de 60 micras para separar el tejido no disociado, después la colagenasa fue neutralizada mediante la adición de 5 ml de D-MEM, que contiene un 10% de SBF y 1% de antibiótico-antimicótico. Se recogió el medio en un tubo de 14 ml y se centrifugó a 1200 rpm x 10 minutos. El sedimento fue resuspendido en 5 ml de una solución de cloruro de amonio y dejado durante 10 minutos en este medio en el baño termostático (baño maría) a 37 °C; luego se centrifugó otros 10 minutos a 1.200 rpm. El nuevo sedimento resuspendido en 3 ml DMEM con antibiótico-antimicótico más SBF se sembraron en 3 placas de 35 mm de diámetro, a razón de una densidad de 100.000 células por mililitro, completándose el volumen hasta 2 ml con el mismo medio DMEM con SBF. Las placas se incubaron durante 30 minutos en una estufa a 37 °C con 5% de CO<sub>2</sub> y saturación de humedad; pasado ese tiempo, en el que se adhirieron las células CMMTA (células madre mesenquimales de tejido adiposo), se sacan de la estufa y se retira el medio que tenían, añadiendo medio fresco con SBF. Nuevamente se llevan a la incubadora en las mismas condiciones de presión, temperatura y saturación de CO<sub>2</sub>. Los cultivos son cambiados de medio cada 2 días y mantenidos hasta la subconfluencia en las mismas condiciones

### **Cultivo secundario: desprendimiento y subcultivo de CMMTA autólogo**

Se observaron las células en el microscopio invertido y de contraste de fase; verificando que las CMMTA estén confluentes. Se retiró el medio de la placa sin que se sequen y se añadió 1 ml de solución de Hank's (para lavar los restos de medio y retirar el ion calcio con el fin de que las células se desprendan más fácilmente). Se añadió 1 ml de solución de tripsina, se dejó 10 s y se retiró dejando una fina película en la placa. Se esperó hasta

que las células se desprendieran, ayudando con sacudidas suaves a la placa y se comprobó en el microscopio si se desprendieron. Se añadió 1 ml de medio, se homogenizó en la placa y se pasó a un tubo para centrifugar a 2.000 rpm x 2 minutos, luego se retiró el sobrenadante y se añadió nuevo medio D-MEM con SBF. Se homogenizó con la pipeta, se tomaron 20 µl de medio y se colocaron en el cubre objeto. Luego se añadió otro 20 µl de disolución de azul tripán, y se cogió 20 µl de la mezcla para contar con la cámara de Neubauer el número de células. Se sembró con una densidad de 100.000 células por ml en placas de 35 mm, añadiendo DMEM con SBF hasta los 2 ml.

Una vez que las CMMTA están en el tercer pase, confluentes y homogéneas, se desprendieron de la placa y se contaron en la cámara de Newbawer. Para ello se retiró de la suspensión celular 20 µl de contenido y se colocó en un portaobjetos, se puso otro 20 µl de la disolución de azul tripán y se mezcló; de dicha mezcla se retiraron 20 µl que se colocaron en la cámara de Newbawer. Se calculó el número de células vivas que hay en un mm<sup>2</sup>.

### **Extracción dental y colocación de CMMTA en sedimento en los alveolos**

Se pesó a la rata control (290 g) y rata experimental (280 g) y se anestesiaron con Ketamina y Xylacina por inyección intraperitoneal. Se colocó alcohol yodado en la zona a extraer para desinfectar y con el botador curvo acanalado se desbridó la encía del alveolo del primer molar superior derecha e izquierda de la rata experimental y de la rata control sólo la molar superior derecha. Luego con el fórceps pediátrico se realizaron movimientos de luxación mesial-distal, bucal-lingual respectivamente extrayendo el diente y se retiró algún tejido sobrante con la cureta de alveolo Hemingway y se estimuló el coágulo haciendo compresión. En ese momento se colocó 200 mil células desprendidas de las placas de cultivo para los alveolos dentales del primer molar superior derecho e izquierdo recién extraído. Al día siguiente de la extracción dentaria se añadió 100 mil células sólo al alveolo dental superior derecho.

Los animales fueron evaluados clínicamente el día 14, 21, 28 con espejo bucal y sonda periodontal. En cada evaluación clínica se tomaron registros fotográficos con una cámara fotográfica (Olympus). El día 42 fueron sacrificados los animales.

### **Fijación y preparación de las muestras**

Se anestesió con Ketamina y Xylacina a los animales control y experimental, después se abrió la cavidad torácica haciendo un corte longitudinal a nivel del esternón. Se administró 1 ml heparina al 1% (como anticoagulante) más 1 ml de nitrito sódico al 1% (como vasodilatador) en la vena cava izquierda. Después se introdujo una cánula en el ventrículo izquierdo y se pasó tampón fosfato salino durante 3 minutos, hasta que salió toda la sangre. Posteriormente se fijó por perfusión con paraformaldehído tamponado al 4% durante 10 minutos hasta conseguir la rigidez en el animal. Seguidamente se le cortó la cabeza, y de ella se desecharon los tejidos innecesarios de la zona específica que interesó como muestra (un bloque de 1 cm). Se dejó la muestra en un envase convenientemente identificado con el código del animal y fecha, en paraformaldehído tamponado al 4 % durante 24 horas. A continuación se lavó la muestra en tampón fosfato con 0.1 molar y con pH 7.4.

### **Deshidratación, inclusión y observación histológica**

Se deshidrató las muestras con acetonas de gradación decrecientes, desde -50%, -70%, -80% 15 min, luego a -96%, -100%, -óxido de propileno 2x 15 min. Luego se sumergieron las muestras en una mezcla al 50% de óxido de propileno e hipoxiresina durante 2 horas.

Se mezclaron los componentes de la hipoxiresina (Spurr), ERL (10gr), DER (6.5 gr), NSA (26 gr), DMAE (0.4 gr) y se polimerizó en estufa a 60 °C por toda una noche. Se cortaron las muestras con una sierra lineal de precisión (BUEHLER 4000) con un espesor de 300 micras. Los cortes se tiñeron con alizarina al 1% por 1 minuto, lavándolas con suero fisiológico y dejándolo secar al ambiente. Se observó la estructura general del corte en la lupa (Laica) empleando su respectivo programa informático. Las mejores áreas de los cortes de cada molar (derecha, izquierda del animal experimental y el molar izquierdo del control) se seleccionaron para analizar, los efectos de las CMMTA en el alveolo después de 42 días de extracción dental.



**RESULTADOS:**

**EVOLUCIÓN CLÍNICA DE LAS MUESTRAS: 14, 21, 28, 42 días después de la extracción dental.**



Fig. N° 14: Rata experimental 2872. Evaluación clínica después de 14 días la extracción dental.



Fig. N° 15: Rata 2880 control. Evaluación clínica después de 14 días la extracción dental.

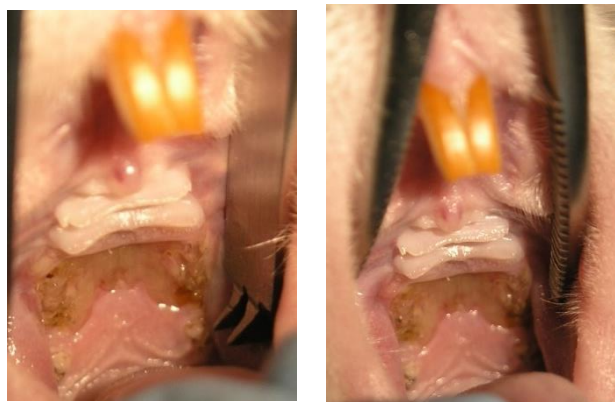


Fig. N° 16: Rata 2872 experimental. Evaluación clínica después de 21 días la extracción dental.



Fig. N° 17: Rata 2872 experimental. Evaluación clínica después de 28 días la extracción dental.



Fig. N° 18: Rata 2880 control. Evaluación clínica después de 28 días la extracción dental.



Fig. N° 19: Rata 2872 experimental. Evaluación clínica después de 42 días la extracción dental.



Fig. N° 19: Rata 2880 control. Evaluación clínica después de 42 días la extracción dental.

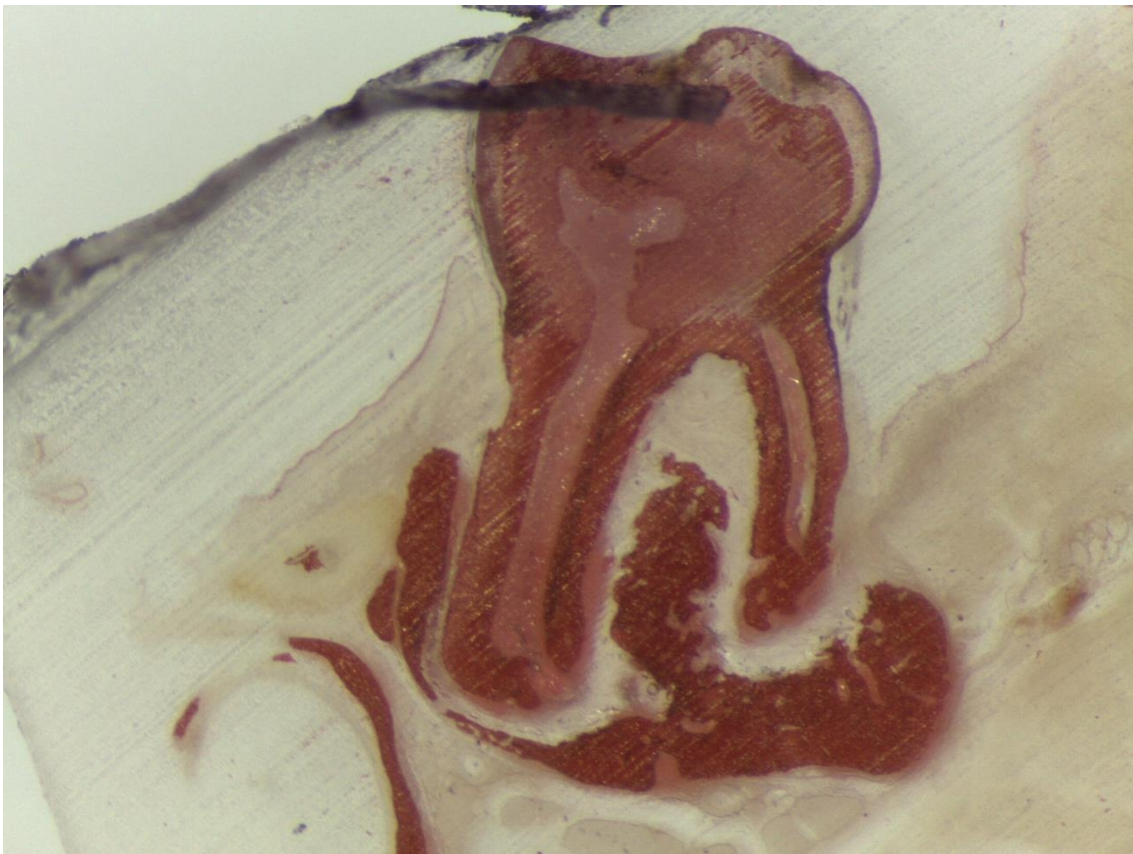


Fig. N° 20: Rata 2880 control. Diente sano, sin extracción.

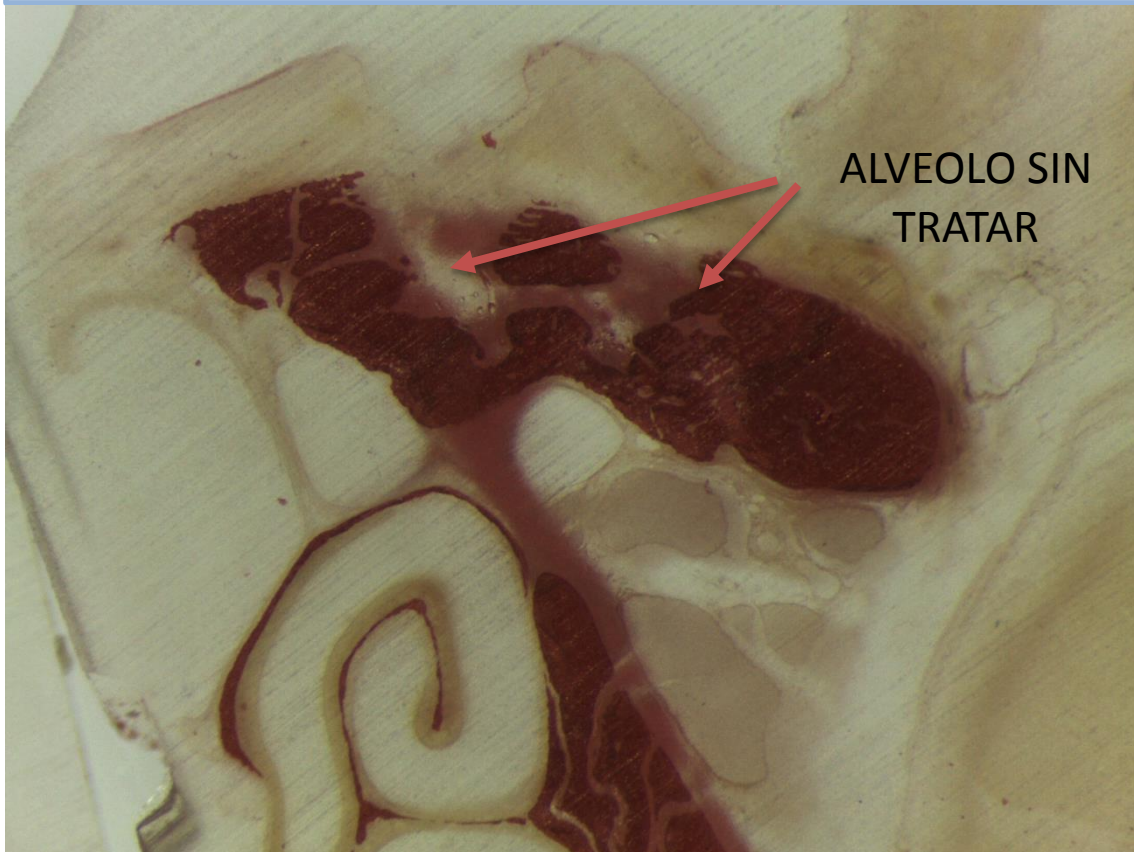


Fig. N° 21: Rata 2880 control. Alveolo extraído sin tratamiento.



Fig. N° 22: Molar izquierda. Alveolo extraído con tratamiento de 200 mil CMMTA.

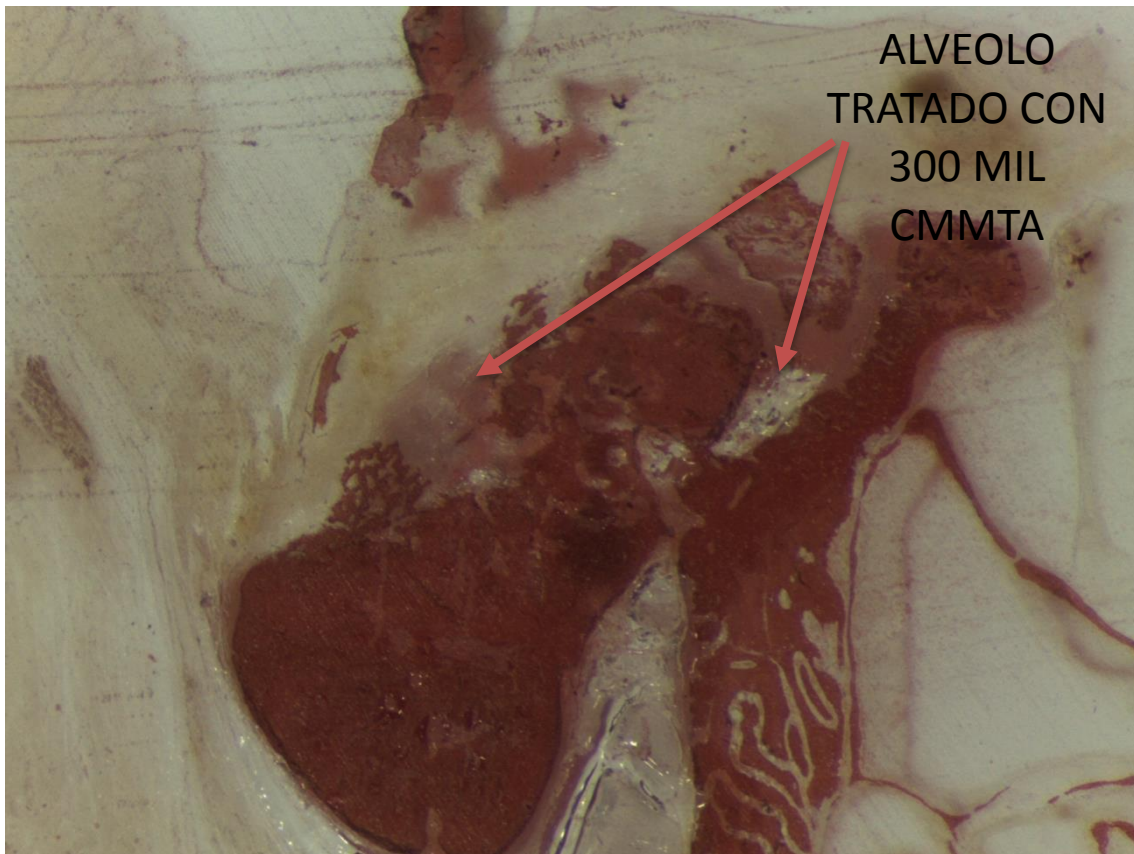


Fig. N° 23: Molar derecha. Alveolo extraído con tratamiento de 300 mil CMMTA.

En la Fig. 21 se observa menor tejido óseo en comparación con la Fig. 22 y 23 respectivamente. Se puede verificar con la tinción de alizarina al 1% (visibiliza el calcio) que existe una mejor cicatrización alveolar en las molares tratadas después de la extracción dental.

## LIMITACIONES ENCONTRADAS

- Inicialmente el material no ha sido adecuado para las extracciones dentarias
- Lo anterior, produjo un mayor defecto en el animal experimental que control
- Ha sido corto tiempo para tener mayores resultados
- Se han desarrollado situaciones imprevistas (avería de la sierra de corte de las muestras)

## LECCIONES APRENDIDAS

- Realizar mi TFM en una línea de investigación interesante y coherente a la odontología
- Tener prisa en las revisiones bibliográficas y poder discriminar y seleccionar información pertinente
- Conocer un amigo silencioso como el REFWORD
- Aprender a realizar cultivos primarios y secundarios
- Adaptarme en el campo de la biología celular e histología, para poder entender inicialmente de qué trataría mi TFM, especialmente, qué quiero investigar y para qué es útil en mi profesión.

## **CONCLUSIONES**

Este trabajo no tiene la categoría de conclusiones. Se trata del inicio de la tesis doctoral, por ello no es concluyente. Los resultados obtenidos nos indican que las CMMTA contribuyen con una mejor mineralización del alveolo tratado con éstas células, que del alveolo control.

### **AGRADECIMIENTOS:**

En principio, deseo agradecer al Dr. Manuel J. Gayoso que me entusiasmo con su línea de investigación. Por su paciencia y sus recomendaciones en la andadura de este estudio. Vine desde Perú para estudiar la toxicidad de las amalgamas y luego me fui enamorando de este tema de investigación. Me gusta mucho, es interesante y es el inicio desde luego de mi trabajo doctoral.

Agradezco a Rogelio, Luis y Teresa y a todas las personas del departamento que han hecho posible este avance.

A mi familia, a mi esposo Luis y a mí querida Laia que aún sin comprender muy bien, está conmigo donde camino.



## BIBLIOGRAFÍA:

- Aguirre, J., Akhter, M., Kimmel, D., Pingel, J., Williams, A., Jorgensen, M., et al. (2012). Oncologic doses of zoledronic acid induce osteonecrosis of the jaw-like lesions in rice rats (*oryzomys palustris*) with periodontitis. *J Bone Miner Res.*, 27(10)(2130-43), <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jbmr.1669/epdf>-  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22623376>.
- Ailhaud, G., Grimaldi, P., & Négrel, R. (Julio 1992). *Cellular and molecular aspects of adipose tissue development* - Annual Reviews.
- Al Batran, R., Al-Bayati, F., & Al-Obaidi, M. (2013). In-vivo effect of andrographolide on alveolar bone resorption induced by porphyromonas gingivalis and its relation with antioxidant enzymes. *BioMed Research International*, 2013(276.329), <http://dx.doi.org/10.1155/2013/276329>-  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24151590>.
- Amler, M. (1969).  
The time sequence of tissue regeneration in human extraction wounds. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 27(309-18), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5251474>.
- Amler, M. (1993). Age factor in human alveolar bone repair. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 19(138-42)
- Araújo, M., & Lindhe, J. (2005). Dimensional ridge alterations following tooth extraction. An experimental study in the dog. *Journal of Clinical Periodontology*, 32(212-218), <http://onlinelibrary.wiley.com/wol1/doi/10.1111/j.1600-051X.2005.00642.x/full>-<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15691354>.

- Araújo, M., & Lindhe, J. (2009). Ridge alterations following tooth extraction with and without flap elevation: An experimental study in the dog. *Clinical Oral Implants Research*, 20(545–549), <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1600-0501.2008.01703.x/abstract>-<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19515033>.
- Araújo, M., Sukekava, F., Wennström, J., & Lindhe, J. (2005). Ridge alterations following implant placement in fresh extraction sockets: an experimental study in the dog. *Journal of Clinical Periodontology*, 32(645–652), <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1600-051X.2005.00726.x/abstract>-<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15882225>.
- Athanasou, N. (2011). The osteoclast—what’s new? *Skeletal Radiol*, 40 (9)(1137–1140), [http://download-v2.springer.com/static/pdf/690/art%253A10.1007%252Fs00256-011-1180-9.pdf?token2=exp=1432031797~acl=%2Fstatic%2Fpdf%2F690%2Fart%25253A10.1007%25252Fs00256-011-1180-9.pdf\\*~hmac=f466f91fa8c82524d6324dea98d92e62fa7e14778a04e089f4d7b04dcd66d46b](http://download-v2.springer.com/static/pdf/690/art%253A10.1007%252Fs00256-011-1180-9.pdf?token2=exp=1432031797~acl=%2Fstatic%2Fpdf%2F690%2Fart%25253A10.1007%25252Fs00256-011-1180-9.pdf*~hmac=f466f91fa8c82524d6324dea98d92e62fa7e14778a04e089f4d7b04dcd66d46b)-<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21847745>.
- Bainbridge, B., Verma, R., Eastman, C., Yehia, B., Rivera, M., Moffatt, C., et al. (2010). Role of porphyromonas gingivalis phosphoserine phosphatase enzyme SerB in inflammation, immune response, and induction of alveolar bone resorption in rats. *Infect Immun.*, 78 (11)(4560–9), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2976320/pdf/0703-10.pdf>-<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20805334>.
- Bastos, M., Brilhante, F., Gonçalves, T., Pires, A., Napimoga, M., Marques, M., et al. (2010). Hypertension may affect tooth-supporting alveolar bone quality: A study in rats. *J Periodontol.*, 81 (7)(1075–83), [http://www.joponline.org/doi/abs/10.1902/jop.2010.090705?url\\_ver=Z39.88-2003&rfr\\_id=ori:rid:crossref.org&rfr\\_dat=cr\\_pub%3dpubmed](http://www.joponline.org/doi/abs/10.1902/jop.2010.090705?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%3dpubmed)-<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20350157>.

- Blanco, J., Nuñez, V., Aracil, L., Muñoz, F., & Ramos, I. (2008). Ridge alterations following immediate implant placement in the dog: Flap *versus* flapless surgery. *Journal of Clinical Periodontology*, 35(640-648), <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1600-051X.2008.01237.x/abstract>-<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18422696>.
- Cardaropoli, G., Araújo, M., & Lindhe, J. (2003). Dynamics of bone tissue formation in tooth extraction sites. an experimental study in dogs. . *J Clin Periodontol*, 30(809-818.), <http://onlinelibrary.wiley.com/wol1/doi/10.1034/j.1600-051X.2003.00366.x/full>.
- Chen, C., Garber, L., Smoak, M., Fargason, C., Scherr, T., Blackburn, C., et al. (2015). In vitro and in vivo characterization of pentaerythritol triacrylate-co-trimethylolpropane nanocomposite scaffolds as potential bone augments and grafts. *Tissue Engineering. Part A*, 21(1-2), 320-331.
- Chen, R., Kanzaki, H., Chiba, M., Nishimura, M., Kanzaki, R., & Igarashi, K. (2008). Local osteoprotegerin gene transfer to periodontal tissue inhibits lipopolysaccharide-induced alveolar bone resorption. *J Periodontal Res.*, 43(2)(237-45), <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1600-0765.2007.01021.x/epdf>-<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18086145>.
- Chen, S., Wilson, T. J., & Hämmerle, C. (2004). Immediate or early placement of implants following tooth extraction: review of biologic basis, clinical procedures, and outcomes. *Int J Oral Maxillofac Implants.*, 19(12-25), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15635942>.
- Colli, V., Okamoto, R., Spritzer, P., & Dornelles, R. (2012). Oxytocin promotes bone formation during the alveolar healing process in old acyclic female rats. *Arch Oral Biol.*, 57(9)(1290-7), [http://ac.els-cdn.com/S0003996912001021/1-s2.0-S0003996912001021-main.pdf?\\_tid=5c478728-fada-11e4-a0e5-00000aacb35f&acdnt=1431677828\\_77b3c5a46bef2a0b54a0465a0d6de723](http://ac.els-cdn.com/S0003996912001021/1-s2.0-S0003996912001021-main.pdf?_tid=5c478728-fada-11e4-a0e5-00000aacb35f&acdnt=1431677828_77b3c5a46bef2a0b54a0465a0d6de723)-<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22525945>.

- Cruz, A. C., Caon, T., Menin, A., Granato, R., Boabaid, F., & Simoes, C. M. (2015). Adipose-derived stem cells incorporated into platelet-rich plasma improved bone regeneration and maturation in vivo. *Dental Traumatology : Official Publication of International Association for Dental Traumatology*, 31(1), 42-48.
- Cuoghi, O., Aiello, C., Consolaro, A., Tondelli, P., & Mendonça, M. (2014). Resorption of roots of different dimension induced by different types of forces. *Brazilian Oral Research*, 28(0013), <http://www.scielo.br/pdf/bor/v28n1/1807-3107-bor-28-1-1807-3107BOR-2014vol280013.pdf>-  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24918365>.
- Du, Z., Lee, R. S., Hamlet, S., Doan, N., Ivanovski, S., & Xiao, Y. (2015). Evaluation of the first maxillary molar post-extraction socket as a model for dental implant osseointegration research. *Clinical Oral Implants Research*,
- Elian, N., Cho, S., Froum, S., Smith, R., & Tarnow, D. (2007). A simplified socket classification and repair technique. *Pract Proced Aesthet Dent.*, 19 (2)(99-104), <http://www.zimmerdental.fr/access-dam/51f0de85dbf9ca443500000e/1/inline/Tarnow%20num%C3%A9ris%C3%A9.pdf>-<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17491484>.
- Faloni, A. P. d. S., Sasso-Cerri, E., Rocha, F. R. G., Katchburian, E., & Cerri, P. S. (2012). Structural and functional changes in the alveolar bone osteoclasts of estrogen-treated rats. *Journal of Anatomy*, 220(1), 77-85.
- Fawzy El-Sayed, K. M., Dorfer, C., Fandrich, F., Gieseler, F., Moustafa, M. H., & Ungefroren, H. (2013). Adult mesenchymal stem cells explored in the dental field. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 130, 89-103.

- Feitosa, D., Marques, M., Casati, M., Sallum, E., & Nociti, F.H.Jr., de Toledo, S. (2009). The influence of thyroid hormones on periodontitis-related bone loss and tooth-supporting alveolar bone: A histological study in rats. *J Periodontal Res.*, 44(4)(472-8), <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1600-0765.2008.01144.x/epdf>-  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18973522>.
- Fickl, S., Zuhr, O., Wachtel, H., Bolz, W., & Huerzeler, M. (2008). Hard tissue alterations after socket preservation: an experimental study in the beagle dog. *Clinical Oral Implants Research*, 19(1111-1118), <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1600-0501.2008.01575.x/abstract>-  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18983313>.
- Fickl, S., Zuhr, O., Wachtel, H., Bolz, W., & Huerzeler, M. (2008). Hard tissue alterations after socket preservation: An experimental study in the beagle dog. *Clin Oral Implants Res.*, 19 (11)(1111-8), <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1600-0501.2008.01575.x/pdf>-  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18983313>.
- Fraser, J. K., Wulur, I., Alfonso, Z., & Hedrick, M. H. (2006). Fat tissue: An underappreciated source of stem cells for biotechnology. *Trends in Biotechnology*, 24(4), 150-154.
- Fukuoka, H., Daigo, Y., Enoki, N., Taniguchi, K., & Sato, H. (2011). Influence of carbon dioxide laser irradiation on the healing process of extraction sockets. *Acta Odontol Scand.*, 69 (1)(33-40), <http://informahealthcare.com/doi/abs/10.3109/00016357.2010.517556>-  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20863148>.
- Furfaro, F., Ang, E., Lareu, R., Murray, K., & Goonewardene, M. (2014). A histological and micro-CT investigation in to the effect of NGF and EGF on the periodontal, alveolar bone, root and pulpal healing of replanted molars in a rat model - a pilot study. *Progress* in

*Orthodontics*, 15:2, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3896721/pdf/2196-1042-15-2.pdf>-<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24393534>.

Gimble, J. M., Katz, A. J., & Bunnell, B. A. (2007). Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circulation Research*, 100(9), 1249-1260.

Han, X., LaRosa, K., Kawai, T., & Taubman, M. (2014). DNA-based adaptive immunity protect host from infection-associated periodontal bone resorption via recognition of *P. gingivalis* virulence component. *Vaccine*, 32 (2)(297-303), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3872268/pdf/nihms524962.pdf>-<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24051159>.

Housman, T. S., Lawrence, N., Mellen, B. G., George, M. N., Filippo, J. S., Cervený, K. A., et al. (2002). The safety of liposuction: Results of a national survey. *Dermatologic Surgery*, 28(11), 971-978.

Iasella, J., Greenwell, H., Miller, R., Hill, M., Drisko, C., Bohra, A., et al. (2003). Ridge preservation with freeze-dried bone allograft and a collagen membrane compared to extraction alone for implant site development: A clinical and histologic study in humans. [http://www.joonline.org/doi/abs/10.1902/jop.2003.74.7.990?url\\_ver=Z39.88-2003&rfr\\_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&rfr\\_dat=cr\\_pub%3Dpubmed&](http://www.joonline.org/doi/abs/10.1902/jop.2003.74.7.990?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&rfr_dat=cr_pub%3Dpubmed&), 74(990-999), [http://www.joonline.org/doi/abs/10.1902/jop.2003.74.7.990?url\\_ver=Z39.88-2003&rfr\\_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&rfr\\_dat=cr\\_pub%3Dpubmed&](http://www.joonline.org/doi/abs/10.1902/jop.2003.74.7.990?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&rfr_dat=cr_pub%3Dpubmed&)-<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12931761>.

Irinakis, T. (2006). Rationale for socket preservation after extraction of a single-rooted tooth when planning for future implant placement. *J Can Dent Assoc.*, 72(917-22), <http://www.cda-adc.ca/jcda/vol-72/issue-10/917.pdf>-<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17187706>.

Ju, D., Han, L., Guo, Z., Bian, J., Li, F., Chen, S., et al. (2015). Effect of diameter of poly(lactic acid) fiber on the physical properties of poly(varepsilon-caprolactone). *International Journal of Biological Macromolecules*, 76, 49-57.

- Kuroshima, S., Al-Salihi, Z., & Yamashita, J. (2013). Parathyroid hormone related to bone regeneration in grafted and nongrafted tooth extraction sockets in rats. *Implant Dent.*, 22 (1)(71-76),<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23296032>.
- Lecuona, M., Castell, A., Sampedro, E., Acevedo, S., Guerrero, A., & Fernández, A. (2015). Tejido óseo. In M. Lecuona, A. Castell, E. Sampedro, S. Acevedo, A. Guerrero & A. Fernández (Eds.), *Compendio de histología médica y biología celular* (Primera Edición ed., pp. 132-148). Barcelona, España: ELSEVIER.
- Lee, H. R., Kim, H. J., Ko, J. S., Choi, Y. S., Ahn, M. W., Kim, S., et al. (2013). Comparative characteristics of porous bioceramics for an osteogenic response in vitro and in vivo. *PLoS One*, 8(12), e84272.
- Lin, F., Hsiao, F., Huang, C., Shih, C., Tsao, N., Tsai, C., et al. (2014). Porphyromonas gingivalis GroEL induces osteoclastogenesis of periodontal ligament cells and enhances alveolar bone resorption in rats. *PLoS One*, 9(102450),<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4109931/pdf/pone.0102450.pdf>-<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25058444>.
- Llodra Calvo, J. (2012). Encuesta de salud oral en españa 2010. *Rcoe*, 17 (1)(13-46), <http://www.consejodentistas.es/pdf/RCOE4/RCOE4.pdf>.
- Longhini, R., Aparecida de Oliveira, P., Sasso-Cerri, E., & Cerri, P. (2014). Cimetidine reduces alveolar bone loss in induced periodontitis in rat molars. *Journal of Periodontology*, 85 (8)(1115-1125),[http://www.joponline.org/doi/abs/10.1902/jop.2013.130453?url\\_ver=Z39.88-2003&rfr\\_id=ori:rid:crossref.org&rfr\\_dat=cr\\_pub%3dpubmed-](http://www.joponline.org/doi/abs/10.1902/jop.2013.130453?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%3dpubmed)  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24283656>.
- Macedo, R. M., Lacerda, S. A., Thomazini, J. A., & Brentegani, L. G. (2014). Bone integration behavior of hydroxyapatite/beta-tricalcium phosphate graft implanted in dental alveoli: A histomorphometric and scanning electron microscopy study. *Implant Dentistry*, 23(6), 710-715.

- Meruane, M., & Rojas, M. (2010). Adipose tissue derived stem cells. *Int. J. Morphol.*, 28 (3)(879-889), [http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0717-95022010000300035](http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-95022010000300035).
- Metzger, Z., Belkin, D., Kariv, N., Dotan, M., & Kfir, A. (2008). Low-dose doxycycline inhibits bone resorption associated with apical periodontitis. *Int Endod J.*, 41 (4)(303-9), <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2591.2007.01363.x/epdf>-<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18217992>.
- Mijares, D., Kulkarni, A., Lewis, K., Yao, F., Xi, Q., Tannous, S., et al. (2012). Oral bone loss induced by mineral deficiency in a rat model: Effect of a synthetic bone mineral (SBM) preparation. *Arch Oral Biol.*, 57 (9)(1264-73), <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003996912000696#>-<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22424637>.
- Nakatsu, S., Yoshinaga, Y., Kuramoto, A., Nagano, F., Ichimura, I., Oshino, K., et al. (2014). Occlusal trauma accelerates attachment loss at the onset of experimental periodontitis in rats. *Journal of Periodontal Research*, 49 (3)(314-322), <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jre.12109/abstract>-<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jre.12109/abstract>.
- Nakatsuka, Y., Nagasawa, T., Yumoto, Y., Nakazawa, F., & Furuichi, Y. (2014). Inhibitory effects of sword bean extract on alveolar bone resorption induced in rats by porphyromonas gingivalis infection. *J Periodont Res.*, 49 (6)(801-809), <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jre.12166/epdf>-<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24494651>.
- Nampo, T., Watahiki, J., Enomoto, A., Taguchi, T., Ono, M., Nakano, H., et al. (2010). A new method for alveolar bone repair using extracted teeth for the graft material. *J Periodontol.*, 81 (9)(1264-72), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20476887>-[http://www.joponline.org/doi/abs/10.1902/jop.2010.100016?url\\_ver=Z39.88-2003&rfr\\_id=ori:rid:crossref.org&rfr\\_dat=cr\\_pub%3dpubmed](http://www.joponline.org/doi/abs/10.1902/jop.2010.100016?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%3dpubmed).



- Odabas, S., Elcin, A. E., & Elcin, Y. M. (2014). Isolation and characterization of mesenchymal stem cells. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1109, 47-63.
- Oliveira, T., Sakai, V., Machado, M., Dionísio, T., Cestari, T., Taga, R., et al. (2008). COX-2 inhibition decreases VEGF expression and alveolar bone loss during the progression of experimental periodontitis in rats. *J Periodontol.*, 79 (6)(1062-9), [http://www.joponline.org/doi/abs/10.1902/jop.2008.070411?url\\_ver=Z39.88-2003&rfr\\_id=ori:rid:crossref.org&rfr\\_dat=cr\\_pub%3dpubmed](http://www.joponline.org/doi/abs/10.1902/jop.2008.070411?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%3dpubmed)-  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18533784>.
- Orozco García, M. N., Gayoso Rodríguez, M. J., & Universidad de Valladolid. (2010). *Influencia del cocultivo en las características morfológicas e inmunohistoquímicas de células de schwann y células madre de tejido adiposo de rata*. Sl.: S.N.
- Polimeni, G., Koo, K., Pringle, G., Agelan, A., Safadi, F., & Wikesjö, U. (2008). Histopathological observations of a polylactic acid-based device intended for guided Bone/Tissue regeneration. *Clin Implant Dent Relat Res.*, 10 (2)(99-105),<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1708-8208.2007.00067.x/epdf>-  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18462206>.
- Rodrigues, W., Madeira, M., da Silva, T., Clemente-Napimoga, J., Miguel, C., Dias-da-Silva, V., et al. (2012). Low dose of propranolol down-modulates bone resorption by inhibiting inflammation and osteoclast differentiation. *Br J Pharmacol.*, 165 (7)(2140-51), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3413852/pdf/bph0165-2140.pdf>-<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21950592>.
- Seibert, J. (1983). *Reconstruction of deformed, partially edentulous ridges, using full thickness onlay grafts. part II. Prosthetic/periodontal interrelationships*.

- Seto, H., Ohba, H., Tokunaga, K., Hama, H., Horibe, M., & Nagata, T. (2008). Topical administration of simvastatin recovers alveolar bone loss in rats. *J Periodont Res*, 43 (3)(261-7), <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1600-0765.2007.01024.x/epdf>-<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18447852>.
- Silva, J., Lopes Ferrucci, D., Peroni, L., de Paula, I. E., Rossa-Junior, C., Carvalho, H., et al. (2012). Periodontal disease-associated compensatory expression of osteoprotegerin is lost in type 1 diabetes mellitus and correlates with alveolar bone destruction by regulating osteoclastogenesis. *Cells Tissues Organs*, 196 (2)(137–150), <http://www.karger.com/Article/Abstract/330879>-<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22301390>.
- Soboku, K., Kikuchi, T., Fujita, S., Takeda, H., Naruse, K., Matsubara, T., et al. (2014). Altered gene expression in gingival tissues and enhanced bone loss in rats with diabetes with experimental periodontitis. *Journal of Periodontology*, 85 (3)(455-464), [http://www.joponline.org/doi/abs/10.1902/jop.2013.120705?url\\_ver=Z39.88-2003&rfr\\_id=ori:rid:crossref.org&rfr\\_dat=cr\\_pub%3dpubmed](http://www.joponline.org/doi/abs/10.1902/jop.2013.120705?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%3dpubmed)-<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jre.12109/abstract>.
- Veronesi, F., Giavaresi, G., Guarino, V., Raucci, M. G., Sandri, M., Tampieri, A., et al. (2015). Bioactivity and bone healing properties of biomimetic porous composite scaffold: In vitro and in vivo studies. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A*,
- Young, H. E., Mancini, M. L., Wright, R. P., Smith, J. C., Black, A. C., Reagan, C. R., et al. (1995). Mesenchymal stem cells reside within the connective tissues of many organs. *Developmental Dynamics*, 202(2), 137-144.