

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**



TESIS DOCTORAL

**Evaluación de los injertos alógenicos en bloque para
regeneración horizontal**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Francisco González Fernández-Tresguerres

Directores

Jesús Torres García-Denche

Faleh Ahmad Tamimi Mariño

Jesús Ángel Fernández-Tresguerres Hernández

Madrid

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Odontología



**EVALUACIÓN DE LOS INJERTOS ALOGÉNICOS EN BLOQUE PARA
REGENERACIÓN HORIZONTAL**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR PRESENTADA POR

Francisco González Fernández-Tresguerres

DIRECTORES

Prof. Jesús Torres García-Denche

Prof. Faleh Ahmad Tamimi Mariño

Prof. Jesús Ángel Fernández-Tresguerres Hernández

Madrid 2021

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA



TESIS DOCTORAL

EVALUACIÓN DE LOS INJERTOS ALOGÉNICOS EN BLOQUE PARA REGENERACIÓN
HORIZONTAL

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Francisco González Fernández-Tresguerres

DIRECTORES

Prof. Jesús Torres García-Denche
Prof. Faleh Ahmad Tamimi Mariño
Prof. Jesús Ángel Fernández-Tresguerres Hernández

AGRADECIMIENTOS

Mi primer agradecimiento es para todo mi equipo de investigación, ya que esta tesis es fruto de la colaboración de muchas personas, y se ha podido desarrollar gracias a las enseñanzas y ayuda de todos ellos.

Especialmente al Profesor Jesús Torres, cuya ayuda ha sido inestimable en todo momento, ha sabido transmitirme su amor por la docencia y la investigación, ha sido un pilar en todo mi aprendizaje, ya que cuando me estaba iniciando en la cirugía él fue mi mentor, compartiendo conmigo sus amplios conocimientos de forma desinteresada, y permitiéndome asistir a todas sus increíbles cirugías, gracias a él me enamoré de la profesión y me contagió su incansable anhelo de seguir aprendiendo; pero especialmente, por ser un apoyo y un gran amigo desde el primer día.

También tengo un profundo agradecimiento a mis otros dos directores, al Profesor Faleh Tamimi, que me acogió en la Universidad de McGill haciéndome sentir como en casa, y me enseñó a realizar y analizar las histologías, inmunohistoquímicas y micro TC desde el primer paso, indispensables para la realización de esta tesis, fue una suerte aprender directamente del que considero uno de los mejores investigadores de nuestra profesión. También quiero agradecer al Profesor Jesús Ángel Fernández-Tresguerres todo el apoyo recibido, al que también considero uno de los mejores profesores e investigadores que he conocido, sus conocimientos y amparo han sido muy importantes a la hora de publicar los artículos, además de ser un referente para mí, siempre se ha mostrado cercano y afable.

Pero mi mayor agradecimiento es para mi familia, los principales responsables de todos mis éxitos. A mi hermano Fer, por estar a mi lado en todo momento, ser uno de los pilares de mi vida y ayudarme a crecer como persona. A mi padre, quien desde pequeño supo transmitirme su amor por el conocimiento, la literatura y el deporte, por enseñarme a

pensar por mí mismo, por dejarme tomar mis propias decisiones sin cuestionarme, y cuando me equivocaba, comprensivo y amable, solo quería asegurarse de que había aprendido algo nuevo, todos los consejos que me ha dado a lo largo de estos años siguen muy presentes en mi día a día y seguirán toda mi vida, y mi padre siempre será mi referente como persona. A mi abuela, Mercedes, por ser siempre un ejemplo de trabajo y de constancia, por su amor incondicional y su inmensa amabilidad, por estar siempre conmigo cuando lo necesitaba. Por último, mi más sincero agradecimiento es para mi madre, quien ha sido siempre mi mejor amiga, mi mayor apoyo emocional y mi mejor maestra, a ella le debo haber elegido este camino y no le podría estar más agradecido, ella me ha enseñado todo lo que sé, haciendo siempre un increíble alarde de paciencia, cariño y comprensión; por la educación recibida, por animarme a perseguir mis sueños, por tu infinita bondad y por ser mi mayor referente en lo personal, profesional y académico, muchas gracias mamá.

PREFACIO

La presente tesis doctoral se basa en tres artículos publicados en revistas de impacto:

Artículo 1

Tresguerres, F.G.F., Cortes, A.R.G., Hernandez, G., Cabrejos-Azama, J., Tamimi, F., Torres, J. (2019) “Clinical and radiographic outcomes of allogeneic block grafts for maxillary lateral ridge augmentation: a randomized clinical trial”. *Clinical Implant Dentistry and Related Research*; 21(5):1087-1098. doi: 10.1111/cid.12834.

Artículo 2

Tresguerres, F.G.F., Tresguerres, I., Iglesias, O., Leco, I., Tamimi, F., Torres, J. (2021) “The role of cortical perforations in allogeneic block grafting for lateral augmentation in maxilla. A randomized clinical trial”. *Clinical Implant Dentistry and Related Research*; 23(4):530-542. doi: 10.1111/cid.12996.

Artículo 3

Tresguerres, F.G.F., Torres, J., López-Quiles, J., Hernández, G., Vega, J.A., Tresguerres, I.F. (2020) “The osteocyte: A multifunctional cell within the bone”. *Ann Anat*; 227:151422. doi: 10.1016/j.aanat.2019.151422.

ÍNDICE

I. RESUMEN	9
ABSTRACT	12
II. INTRODUCCIÓN	15
1. Alteraciones dimensionales del reborde alveolar tras la pérdida dentaria	15
2. Regeneración ósea	18
2.1. Injertos	21
2.1.1. Injertos autólogos	23
2.1.2. Injertos alogénicos	24
2.2 Decorticación	27
3. El osteocito como célula clave en el proceso de remodelado óseo	28
III. JUSTIFICACIÓN	31
IV. HIPÓTESIS	31
V. OBJETIVOS	33
VI. MATERIAL Y MÉTODO. RESULTADOS	34
Artículo 1	36
Artículo 2	48
Artículo 3	61
VII. DISCUSIÓN	69
1. Comparación entre aloinjertos y autoinjertos	69

2. Biología de los injertos alogénicos	71
3. Microarquitectura del injerto	74
4. Densidad del lecho receptor y reabsorción del injerto	77
5. Edad del paciente	79
6. Tabaco	80
7. Decorticación en regeneración ósea	81
8. Análisis histomorfométrico e inmunohistoquímico	87
9. Micro TC	92
10. Supervivencia de los implantes	94
11. Uso de membranas	96
VIII. CONCLUSIONES	99
CONCLUSIONS	100
IX. REFERENCES	101

I. RESUMEN

Antecedentes: Tras la pérdida dentaria se producen alteraciones dimensionales del proceso alveolar en tejidos duros y blandos, lo que requiere en algunas ocasiones procedimientos regenerativos previos a la colocación de implantes. Los injertos en bloque constituyen una de las técnicas más empleadas para la regeneración horizontal, siendo el hueso autólogo considerado actualmente como el *gold standard*. Sin embargo, presenta grandes limitaciones como su escasa disponibilidad, la necesidad de un segundo campo quirúrgico y las posibles complicaciones asociadas a la obtención del injerto. En este sentido, los aloinjertos pueden ser una alternativa aceptable.

Objetivos: El objetivo de este trabajo es evaluar la eficacia clínica de estos injertos alogénicos en bloque. En el primer estudio nos centramos en estudiar la tasa de reabsorción, comparando dos aloinjertos con diferente microarquitectura, esponjoso y córticoesponjoso, además de evaluar otros factores que podrían influir en la reabsorción del bloque. El segundo estudio clínico evalúa la influencia de la decorticación del área receptora en la regeneración con bloques alogénicos esponjosos en maxilar. El último estudio se trata de un artículo de revisión que se centra en evaluar el papel de los osteocitos en la reabsorción y remodelado de los injertos.

Material y método: Los dos ensayos clínicos están realizados en humanos. En el primero los pacientes se dividieron en dos grupos; uno recibió bloques esponjosos y otro córtico-esponjosos, se midieron los bloques en el momento de su colocación con un calibre digital, y se comparó con las dimensiones del bloque a los 4 meses de su colocación mediante tomografía computarizada; se evaluó la influencia de los parámetros demográficos y la densidad del lecho receptor en la tasa de reabsorción. En el segundo ensayo clínico los pacientes se dividieron en dos grupos, a uno se le realizó la decorticación del lecho receptor previo a la colocación del bloque y al otro se le mantuvo

intacto; los grupos se compararon mediante histomorfometría, inmunohistoquímica y micro TC, teniendo en cuenta también parámetros demográficos. En ambos estudios se describen parámetros relacionados con la supervivencia de los implantes, midiendo pérdida ósea marginal, profundidad y sangrado al sondaje; estos parámetros se analizaron con un ANOVA de medidas repetidas mientras que el resto de variables fue con un ANCOVA en ambos estudios.

Resultados: Estudio 1: El aloinjerto esponjoso presentó una tasa de reabsorción más alta que el córtico-esponjoso; el hábito tabáquico y una densidad del lecho receptor menor a 185 UH se relacionaron con mayor reabsorción; no se encontraron diferencias en cuanto a edad, género o zona quirúrgica. Estudio 2: No se encontraron diferencias en el análisis con micro TC, histomorfometría y cuantificación de vasos sanguíneos mediante inmunohistoquímica entre ambos grupos, tampoco se encontraron en edad y género. En ambos estudios se evaluaron los parámetros relacionados con los implantes, encontrando una supervivencia del 100% en ambos a los dos años, y ningún caso con signos de periimplantitis. Estudio 3: los osteocitos son las células encargadas de la mecanotransducción y de regular la actividad osteoblástica y osteoclástica; por lo que son esenciales en la reabsorción y neoformación ósea de estos injertos.

Conclusiones: Los injertos en bloque alogénicos representan una opción terapéutica válida para la regeneración ósea horizontal y la ulterior supervivencia de los implantes. El uso del bloque esponjoso, el hábito tabáquico y una baja densidad ósea de la zona receptora contribuyen a unas mayores tasas de reabsorción. La decorticación del lecho receptor no mejora ni la neoformación ósea ni la angiogénesis de los aloinjertos esponjosos en maxilar.

PALABRAS CLAVE: Regeneración ósea horizontal, injertos en bloque, aloinjertos, microarquitectura, tasa de reabsorción, densidad ósea, decorticación, histomorfometría, inmunohistoquímica, micro TC, ensayos clínicos aleatorizados, osteocito, mecanotransducción, remodelado óseo.

ABSTRACT

Background: Tooth loss causes dimensional alterations of the alveolar process in hard and soft tissues, which sometimes result in bone deficiencies that may lead to the need to carry out regenerative procedures prior to implant placement. Bone block grafts are one of the most commonly intervention for horizontal regeneration in a staged approach. The use of autologous blocks is considered as the gold standard, since in comparative studies, this type of bone block was frequently used as the standard control treatment. However, it is limited by its availability, the need of a harvesting surgery and the possible complications associated with it. In this sense, allografts have been suggested as an acceptable alternative.

Objectives: The aim of this work is to evaluate the clinical efficacy of the allogeneic bone block grafts. Two clinical trials were performed. The first one was focused on the resorption rate and factors that could affect it, two allografts with different microarchitectures, cancellous and cortico-cancellous, were compared. The second clinical study evaluates the influence of decortication of the recipient bed on allogeneic grafting with cancellous blocks in the maxilla. The aim of the last review article is to study the role and functions of osteocytes, for developing a biological hypothesis about the clinical behaviour of these grafts.

Methods: Two clinical trials were conducted in humans. In the first one, patients were divided into two groups, one group received cancellous FDBA blocks and the other cortico-cancellous FDBA blocks; the blocks were measured at the time of placement with a digital caliper and compared with the block dimensions 4 months after the regenerative surgery by computed tomography; the influence of demographic parameters and the density of the recipient bed on the resorption rate were also evaluated. In the second clinical trial, patients were divided into two groups, one group underwent

decortication of the recipient bed prior to block placement and in the other the recipient area was left intact; both groups received cancellous FDBA blocks, the groups were compared by histomorphometry, immunohistochemistry and micro CT, also taking into account demographic parameters. Both studies describe parameters related to implant survival, measuring marginal bone loss, depth and bleeding on probing; these parameters were analysed with a repeated measures ANOVA while the rest of the variables were analysed with an ANCOVA in both studies.

Results: Study 1: Cancellous allograft had a higher resorption rate than cortico-cancellous, smoking and a bone density of the recipient bed less than 185 HU were associated with higher resorption; no differences were found for age, gender or surgical site. Study 2: No differences were found in micro CT analysis, histomorphometry and quantification of blood vessels by immunohistochemistry between the two groups, nor were differences found in age and gender. Implant-related parameters were evaluated in both studies, finding 100% survival in both at two years, and no cases with signs of peri-implantitis. Study 3: Osteocytes are mainly responsible for mechanotransduction and for regulating osteoblastic and osteoclastic activity; they are therefore essential in the resorption and bone neof ormation of these grafts.

Conclusions: Allogeneic block grafts represent a valid therapeutic option for horizontal bone regeneration and subsequent implant survival. The bioactive potential of the extracellular matrix, the immune response similar to autologous bone and the promotion of macrophages differentiation to M2 subtype may explain the adequate clinical behaviour. The use of the cancellous block, smoking and low bone density of the recipient site contribute to higher resorption rates. Decortication of the recipient site does not improve bone neof ormation nor angiogenesis within cancellous block allografts in the maxilla.

KEY WORDS: Horizontal bone regeneration, block grafts, allografts, microarchitecture, resorption rate, bone density, decortication, histomorphometry, immunohistochemistry, micro CT, randomised clinical trials, osteocyte, mechanotransduction, bone remodelling.

II. INTRODUCCIÓN

1. Alteraciones dimensionales del reborde alveolar tras la pérdida dentaria

Tras la extracción dentaria se produce de forma inherente una alteración de los tejidos blandos y duros del reborde alveolar; esto es debido, en gran parte, a que el tejido óseo que rodea los dientes es un hueso fascicular especializado (*bundle bone*) que recibe los aportes vasculares y celulares, así como los estímulos funcionales del ligamento periodontal, por lo que, cuando este se pierde, se produce una pérdida de irrigación del hueso alveolar lo que conlleva su reabsorción tanto a nivel vertical como horizontal (Araujo & Lindhe 2005; Cardaropoli y cols. 2003). Los cambios que sufre el proceso alveolar tras la pérdida dentaria se pueden resumir en tres fases (Araujo y cols. 2015):

1. Fase inflamatoria: Esta fase se puede dividir en dos, una primera fase hemostásica y otra de migración de las células inflamatorias. Inmediatamente después de la extracción, se produce una hemorragia lo que conlleva la formación de un coágulo en el interior del alvéolo. Durante los siguientes 2-3 días se produce una migración de células inflamatorias con el fin de limpiar la zona; la combinación de estas células inflamatorias, vasos sanguíneos y fibroblastos inmaduros forman el tejido de granulación. Posteriormente, este tejido de granulación se va reemplazando gradualmente por una matriz provisional de tejido conectivo, rica en fibras colágenas y células.
2. Fase proliferativa: esta fase también se podría dividir en dos, la fase de fibroplasia y la de formación del hueso inmaduro o *woven bone*. En la fase de fibroplasia, la matriz provisional ya está completamente formada, y los vasos sanguíneos penetran esta matriz provisional permitiendo la llegada de osteoblastos, que empiezan a formar *woven bone* a su alrededor; estas proyecciones de *woven bone* en ocasiones pueden rodear por completo un vaso sanguíneo constituyendo una

osteona primaria. Este tejido óseo se encuentra en el alvéolo a partir de la segunda semana, y se caracteriza por ser un tejido muy celular, con una formación rápida, pero con un contenido mineral bajo, por lo que no puede soportar cargas funcionales y debe ser reemplazado por hueso laminar maduro.

3. Fase de modelado y remodelado: El modelado se define como un cambio en la forma y arquitectura del hueso alveolar, mientras que el remodelado hace referencia al recambio del tejido óseo sin afectar a su forma o arquitectura original. La sustitución del *woven bone* por un tejido óseo laminar maduro es remodelado, mientras que la reabsorción de las corticales alveolares se considera modelado. El remodelado óseo del alvéolo es un proceso que puede durar meses y presenta una gran variabilidad interindividual. En un estudio clínico (Lindhe y cols. 2012) se realizaron biopsias de los alvéolos de la zona posterior maxilar, tras menos de 16 semanas desde la extracción, encontrando un 60-65% de hueso laminar y médula ósea, por lo que postulan que el remodelado completo del alvéolo puede tardar varios meses e incluso años. Sin embargo, el modelado tiene lugar antes, se ha descrito que los dos tercios del modelado ocurren en la mayoría de casos en los 3 primeros meses y principalmente en la cortical vestibular, que normalmente es más fina que la lingual (Schropp y cols. 2003).

Estos procesos de modelado y remodelado producen alteraciones en los tejidos duros y blandos del reborde alveolar de la zona edéntula, resultando en la reducción dimensional del reborde alveolar. Estas alteraciones dimensionales han sido analizadas por diversos estudios preclínicos y clínicos, pero cabe destacar los resultados de una revisión sistemática en humanos (Tan y cols. 2012), que describe que tras los 6-7 meses después de la pérdida dentaria se produce una reabsorción horizontal de 3.79 mm a nivel coronal (29-63%), 1.24 mm a nivel vertical (11-22%)

mientras que en mesial era de 0.84 mm y en distal de 0.80 mm. Además, concluyen que esta reabsorción se produce en su mayor parte en los 3 primeros meses, encontrando una reabsorción de 1.2 mm en vestibular, 0.9 mm en lingual y 0.5 mm en interproximal. Mientras que la reabsorción a los 6-7 meses fue entre 0.9- 3.6 mm por vestibular y 0.4- 3 mm en lingual. La menor reabsorción en mesial y distal podría explicarse por la presencia de los dientes adyacentes, gracias a su ligamento periodontal se mantiene el *bundle bone* a ese nivel. Sin embargo, esta reabsorción depende directamente del fenotipo óseo del paciente, es decir, del grosor de la cortical; en fenotipos y corticales finas (<1 mm) la reabsorción será mucho mayor, dado que casi toda esta cortical sería *bundle bone* y muy susceptible a la reabsorción tras la pérdida del diente, especialmente en sentido vertical; en ese sentido, un estudio clínico centrado en la zona anterior maxilar describe una reabsorción vertical de 7.5 mm o 62.3 % y una horizontal de 0.8 mm o 10.5% cuando esta cortical vestibular es menor de 1 mm; y de 1.1 mm o 9.1% en sentido vertical y de 0 mm en sentido horizontal cuando la cortical es mayor de 1 mm (Chappuis y cols. 2013).

Estas alteraciones dimensionales también se producen a nivel de los tejidos blandos, aunque de forma menos evidente. Estos cambios también están relacionados directamente con el fenotipo óseo del paciente, y más de la mitad se producen en las dos primeras semanas. En un estudio clínico enfocado en la zona anterior del maxilar se encontró una media de grosor de los tejidos blandos de 0.7 mm en fenotipos finos y 0.8 mm en fenotipos gruesos. Sin embargo, a las 8 semanas de la extracción el grosor del tejido blando en fenotipos finos aumentó hasta 5.3 mm mientras que en los gruesos se mantuvo estable pasando de 0.8 a 0.7 mm; mientras que a nivel vertical la reducción fue de 1.6 mm en fenotipos finos y 1.4 mm en gruesos (Chappuis y cols. 2015). Esto se puede deber a los cambios dimensionales del tejido óseo; en fenotipos finos se

produce una mayor reabsorción ósea de la cortical vestibular, lo que favorece el crecimiento y proliferación de los tejidos blandos que van a ocupar el espacio que antes ocupaba el tejido óseo, mientras que en fenotipos gruesos esta reabsorción es mucho menos pronunciada, por lo que el espesor de los tejidos blandos presenta menos variaciones; asimismo, un tejido blando grueso presenta mayor cantidad de fibras colágenas y mejor vascularización, lo que le otorga una mejor capacidad de cicatrización.

Esta reabsorción del reborde alveolar puede verse aumentada en ciertos casos, como periodontitis en etapas avanzadas, traumatismos, fracturas verticales radiculares, fracasos endodónticos, edad, largo tiempo de edentulismo, uso de prótesis removibles que ejercen una presión excesiva sobre el reborde alveolar, etc. En estas situaciones de gran reabsorción se debe realizar procedimientos de regeneración ósea previos a la rehabilitación con implantes dentales.

2. Regeneración ósea

La rehabilitación de los pacientes edéntulos con implantes dentales representa una alternativa terapéutica predecible, con tasas de supervivencia elevadas, que van desde el 97.2% a los 5 años al 95.2% a los 10 años (Jung y cols. 2012). Esta alta tasa de supervivencia también se ha descrito en la revisión sistemática de Moraschini y cols (Moraschini y cols. 2015), que reporta una supervivencia media del 94.6% de los implantes en un periodo de más de 10 años, y de 91.2% a los 20 años.

Sin embargo, en la práctica diaria se pueden encontrar frecuentemente situaciones en las cuales no se dispone de la suficiente disponibilidad ósea para la correcta colocación de los implantes dentales. Los procedimientos de regeneración ósea pueden proporcionar el soporte estructural necesario para esos casos, de hecho,

durante la última década se ha generalizado el empleo de las técnicas de regeneración ósea en el mundo de la implantología. El auge de las técnicas de regeneración ósea ha venido de la mano del desarrollo de nuevos biomateriales, que tratan de mejorar el comportamiento del hueso autógeno, considerado por muchos como el *gold standard* en el campo de la regeneración. Actualmente son muchas las líneas de investigación que se basan en la búsqueda del biomaterial ideal. Así, se investigan materiales osteoconductivos que proporcionen una matriz adecuada, junto con sustancias osteoinductivas que favorezcan la formación de hueso de *novo*. Estos materiales pueden ser de origen biológico (injertos de hueso, hueso desmineralizado y liofilizado, membranas de colágeno, etc.) o sintético (partículas de ácido poliláctico o poliglicólico, fosfatos tricálcicos, hidroxiapatitas sintéticas, etc.) (Fu & Wang 2011).

El interés por los sustitutos óseos para el aumento o preservación del proceso alveolar surge a primeros de los años 80 paralelamente al desarrollo de los implantes dentales, aunque los primeros estudios acerca de biomateriales datan de 1920 (Albee 1920). Sin embargo, hasta los años 80 no existen artículos que hagan referencia al desarrollo de nuevos biomateriales. Es a partir de esta fecha cuando se produce un crecimiento exponencial de las publicaciones relacionadas con biomateriales. La razón por la que se ha desarrollado tanto el campo de los biomateriales radica en que entre un 10 y un 20% de los pacientes susceptibles de tratamiento implantológico necesitan procedimientos de regeneración ósea previo al tratamiento con implantes. Además, más del 60% de la población de países industrializados necesita restauración protésica de algún diente idealmente con implantes (Peterson 2006).

Los procedimientos de regeneración ósea se han convertido en intervenciones rutinarias en la práctica implantológica diaria en todo el mundo, en parte debido a la

amplia aceptación de los implantes dentales como el sustituto ideal para la rehabilitación de dientes perdidos. Estos tratamientos juegan un papel muy importante para el éxito de los implantes en aquellas situaciones en las que existe un déficit de volumen óseo en anchura, en altura o de ambas. Y los biomateriales que se utilizan en estos procedimientos constituyen una importante herramienta para conseguir el éxito del tratamiento.

Los procedimientos de regeneración ósea deben seguir una serie de principios biológicos en su cicatrización para lograr el éxito; los principales son:

1. Cierre por primera intención sin tensión: independientemente de la técnica quirúrgica, el cierre primario sin tensión es un factor indispensable en cualquier procedimiento de regeneración, ya que, si se expone el injerto al medio oral, es muy probable que se contamine y no se integre. Por lo que para asegurar el éxito de la regeneración el colgajo debe cubrir por completo la zona regenerada, y tras ser suturado por primera intención mantenerse inmóvil y sin tensión (Wang & Boyapati 2006; Hammerle & Jung 2003).
2. Angiogénesis: La formación de vasos sanguíneos en la zona del injerto es un factor clave para la correcta incorporación del mismo, ya que, estos vasos sanguíneos son los que depositan las células osteogénicas dando lugar a la formación de *woven bone*, que, posteriormente tras remodelarse, se transforma en hueso laminar o maduro (Wang & Boyapati 2006). En este sentido, varios estudios han descrito una relación directa entre la cantidad de vasos sanguíneos y la neoformación ósea (Winet 1996; Carano & Filvaroff 2003).
3. Mantenimiento del espacio: Este factor es especialmente importante en los procesos de regeneración ósea guiada (ROG), donde la membrana tiene la función de crear y mantener un espacio que asegure la correcta proliferación y

diferenciación de las células osteogénicas excluyendo a las células epiteliales y fibroblastos, de crecimiento más rápido. En el caso de los injertos en bloque es el propio injerto quien realiza esta función (Wang & Boyapati 2006).

4. Estabilidad: En las primeras fases de la cicatrización, la estabilidad del coágulo es un factor clave para que se lleve a cabo su correcta diferenciación en tejido de granulación, para que posteriormente se forme una matriz provisional y finalmente *woven bone* y hueso laminar. Esta estabilidad mecánica la puede proporcionar una membrana, un injerto óseo o la combinación de ambas (Wang & Boyapati 2006).

2.1. Injertos

Los injertos pueden ser corticales, esponjosos o mixtos. Las diferencias básicas entre ambos radican en que los esponjosos se incorporan más rápido, ya que la velocidad de revascularización es mayor. La incorporación de los corticales es más lenta, por ello algunos autores han valorado la posibilidad de hacer micro-perforaciones en la cortical para favorecer esta fase de incorporación del injerto. Asimismo, en el injerto esponjoso la actividad de osteoblastos y osteocitos es mayor. En la literatura se describen múltiples técnicas de regeneración ósea en función del defecto, como la distracción ósea, injertos en bloque, *split-crest*, injertos particulados con membranas barrera reabsorbibles o no reabsorbibles, mallas de titanio, etc. El presente trabajo se centra únicamente en defectos horizontales, o clase IV según la clasificación de Cawood y Howell (Cawood & Howell 1998). Las técnicas más comúnmente empleadas en estos defectos son la regeneración ósea guiada (ROG), que consiste en la colocación de un sustituto óseo que mantiene el espacio y actúa como andamiaje para la formación del tejido óseo, y la colocación de una membrana que actúa como barrera frente a la proliferación de fibroblastos y células epiteliales; y los injertos en

bloque, que consisten en la colocación de un bloque óseo en íntimo contacto con el lecho receptor y fijado con tornillos de osteosíntesis (Fu & Wang 2011).

Cuando se coloca un injerto se suceden una serie de fases que son:

a. Incorporación: Es el período en el cual el injerto es capaz de integrarse en la zona receptora. Se calcula que dura unos 4 meses y está en estrecha relación con la revascularización del injerto, teniendo un papel fundamental el VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular).

b. Reemplazo: Es la fase en la que el injerto es reemplazado por tejido óseo neoformado, lo que se denomina en inglés “*creeping substitution process*”. Dura aproximadamente 1 año.

c. Remodelado: Hace referencia al proceso dinámico de reabsorción-formación idéntico al que existe en el hueso normal durante toda la vida. Se trata de un proceso acoplado, equilibrado en condiciones normales, donde es fundamental la intermediación del IGF-I (factor de crecimiento análogo a la insulina) (Khan y cols. 2005).

Las técnicas regenerativas se pueden clasificar en simultáneas, cuando se colocan los implantes en el mismo momento que se realiza la regeneración; o diferidas, cuando se realiza primero la regeneración y tras un periodo de cicatrización se colocan los implantes. En una revisión sistemática reciente (Sanz Sánchez y cols. 2015) se llegó a la conclusión de que la ROG muestra mejores resultados en las técnicas simultáneas, pero la combinación de bloques autólogos y ROG mostró mejores resultados en cuanto a las técnicas diferidas; sin embargo, la supervivencia de los implantes fue superior al 95% en ambos grupos independientemente de la técnica empleada. Esta revisión también describe que el procedimiento más empleado en técnicas diferidas

fue la utilización de injertos en bloque autólogos. En otra revisión (Jensen & Terheyden. 2009) se llegó a la conclusión de que el procedimiento mejor documentado para la regeneración horizontal diferida son los injertos autólogos en bloque. Por lo tanto, los injertos en bloque constituyen una técnica regenerativa ampliamente empleada y estudiada para los defectos óseos horizontales, siendo los autólogos los más utilizados y considerados actualmente como el *gold standard* por la mayoría de autores.

2.1.1. Injertos autólogos

El “autoinjerto” se refiere al tejido óseo obtenido de una parte del organismo del propio paciente e implantado a su vez en una localización diferente en ese mismo individuo. El componente celular del hueso trabecular del injerto óseo contiene pocos osteoblastos y un número importante de células precursoras que sobreviven al trasplante óseo. Estas células precursoras explican el potencial osteogénico del autoinjerto. Es considerado como el *gold standard* en los procedimientos de regeneración ósea debido a sus propiedades de osteogénesis, osteoinducción y osteoconducción. Sin embargo, también existen inconvenientes en el uso de los autoinjertos como la necesidad de un segundo campo quirúrgico, mayor morbilidad del paciente, incremento del tiempo de la cirugía, así como de obtención limitada en caso de los injertos intraorales (Giannoudis et al, 2005). Las propiedades de los autoinjertos, en función de su origen embriológico, se plasman en la tabla 1.

Injerto Óseo	Origen	Disponibilidad	Reabsorción	Presentación
Extraoral				
Calota	IM	+++	++	Bloque/Particulado
Cresta ilíaca	EC	+++	+++	Bloque/Particulado
Tibia	EC	+++	+++	Bloque/Particulado
Intraoral				
Rama	IM	++	++	Bloque/Particulado
Sínfisis	IM	+	++	Bloque/Particulado
Tuberosidad	IM	+	+++	Particulado

Tabla 1. Propiedades del autoinjerto óseo en función de su origen embriológico. (IM: Intramembranoso, EC: endocondral)

2.1.2 Injertos alogénicos

El “aloinjerto” se define como el tejido que ha sido obtenido de un individuo e implantado en otro individuo de la misma especie. El uso del hueso de cadáver para la realización de injertos se conoce como aloinjerto óseo y es considerado por algunos autores como la mejor alternativa al uso de autoinjertos debido a que posee características similares. Aunque las propiedades biológicas del autoinjerto son superiores *a priori*, los aloinjertos tienen la ventaja de evitar una segunda cirugía y la morbilidad asociada a los autoinjertos. Por esta razón los pacientes suelen preferir esta opción. Los aloinjertos se obtienen de banco de tejidos, principalmente en forma de tejido congelado deshidratado (conocido por las siglas en inglés FDBA), como hueso desmineralizado congelado deshidratado (conocido por las siglas en inglés DFDBA) o como hueso fresco congelado, sin procesar (conocido por las siglas en inglés FFB). Estos injertos se pueden conseguir en diferentes formatos, incluyendo

particulado, “chips” de hueso cortical o esponjoso y en forma de bloques de hueso esponjoso y córtico-esponjoso, entre otros (Eppley y cols, 2005). La disponibilidad en forma de bloques de diferentes tamaños ofrece un injerto con muy buenas propiedades mecánicas, aunque ligeramente inferiores si se compara con el hueso autógeno. Estos aloinjertos (FDBA y DFDBA) se procesan mediante diferentes métodos, que incluyen el desbridamiento físico de los tejidos blandos, lavado ultrasónico, tratamiento con etanol para desnaturalizar proteínas y desactivación viral, lavado con antibiótico, congelado a -70°C y desecado. A su vez se puede realizar esterilización mediante radiación gamma y óxido de etileno para eliminar esporas (Khan y cols, 2005). Durante estos procedimientos se producen microfracturas en las fibras de colágeno, haciendo que el aloinjerto disminuya sus propiedades mecánicas si se compara con el autoinjerto. Por esta razón se recomienda la rehidratación del mismo antes de usarlo para recuperar en parte las propiedades mecánicas perdidas. Estos aloinjertos procesados no contienen ninguna célula viva y por lo tanto no tienen potencial osteogénico, sin embargo, sus propiedades osteoconductoras son excelentes. La incorporación del injerto es cualitativamente similar a la del autoinjerto, aunque ocurre de forma más lenta y con presencia de mayor cantidad de hueso necrótico no remodelado (Stevenson 1999). Además, un estudio (Zerbo y cols, 2003) encontró que la mayoría de los osteocitos de un autoinjerto en bloque no sobreviven al proceso de obtención, por lo que estos injertos también pueden ser considerados como injertos no vitales que primero se incorporan y más tarde se van remodelando hasta convertirse en hueso vital, lo que se denomina *creeping substitution process*, siguiendo el mismo proceso que los injertos alogénicos. Adicionalmente, se han atribuido propiedades osteoinductivas a los aloinjertos, postulando inicialmente que podía ser debido a la presencia de BMP (*bone*

morphogenetic proteins), sobre todo en el hueso cortical; sin embargo, un estudio reciente demostró que las BMP están presentes en el hueso cortical autólogo a razón de picogramos por gramo (Li y cols, 2000), por lo que no se consideran cantidades biológicamente activas como para otorgar a este injerto propiedades osteoinductivas (Zara y cols, 2011). Igualmente, podemos postular que los injertos alogénicos tampoco presentan las concentraciones mínimas necesarias para inducir la neoformación ósea. No obstante, los aloinjertos mineralizados mantienen su matriz extracelular, y a ciertos elementos presentes en ella sí se les puede atribuir un potencial regenerativo y osteoinductivo. El colágeno tipo I es la proteína más abundante de la fase orgánica de dicha matriz; esta proteína confiere al hueso sus propiedades biomecánicas y promueve la osteoconducción; por otra parte, las proteínas no colágenas de la matriz, como la osteopontina, osteocalcina, sialoproteínas óseas, proteoglicanos, glicosaminoglicanos, y otros elementos como el magnesio, zinc o estroncio juegan un papel fundamental en las propiedades regenerativas del aloinjerto y en el mantenimiento de su integridad, y pueden ser los responsables del potencial osteoinductivo de estos injertos (Mansour y cols, 2017).

En la tabla 2 podemos observar la comparación entre las propiedades del autoinjerto y del aloinjerto.

Injerto Óseo	Propiedades mecánicas	Osteogénesis	Osteoconducción	Osteoinducción
Autoinjerto				
Esponjoso	No	+++	+++	+++
Córtico-esponjoso	+++	++	++	++
Aloinjerto				
Esponjoso	No	No	++	+
Córtico-esponjoso	+++	No	++	++

Tabla 2. Tabla comparativa de las propiedades del hueso autógeno y el hueso alogénico

2.2 Decorticación en regeneración ósea

La decorticación en regeneración ósea consiste en eliminar parte de la capa cortical externa del lecho receptor, para que el injerto esté en íntimo contacto con el hueso trabecular y no solo con el cortical, y en producir un lecho sangrante. De esta forma se cree que la revascularización del injerto mejorará y la neoformación ósea ocurrirá de forma más rápida, dado que los vasos sanguíneos tardan mucho más en atravesar el hueso cortical, ya que al ser de estructura densa, los vasos deben penetrar por los canales preexistentes, como los de Havers o Volkmans, siendo necesaria cierta actividad osteoclástica previa para ensanchar estos canales; mientras que en el hueso trabecular los vasos sanguíneos pueden penetrar rápidamente a través de los espacios intertrabeculares (Khan y cols, 2005).

Este procedimiento se puede realizar eliminando toda la capa cortical con instrumental rotatorio y una fresa grande, o en lo que se denomina “panal de abeja” realizando una serie de perforaciones de pequeño diámetro atravesando el hueso

cortical hasta llegar a la medular; en nuestro estudio se utilizó este segundo método por ser el más empleado en la literatura.

La decorticación en regeneración ósea fue descrita por Frost (Frost 1983), como un fenómeno regional para acelerar y mejorar la cicatrización ósea en respuesta a un estímulo nocivo. Otros autores postulan que la decorticación acelera la fase 2 de cicatrización del injerto, que corresponde a la osteoinducción, o liberación de factores de crecimiento, que promueven la diferenciación de las células mesenquimales a células del linaje osteoblástico (Greenstein y cols, 2009).

3. El osteocito como célula clave en el proceso de remodelado óseo

El osteocito es la célula más diferenciada de la estirpe osteoblástica. Cuando un osteoblasto deja de sintetizar matriz osteoide, puede transformarse a osteocito, a célula limitante o sufrir apoptosis (Manolagas, 2000). Constituye la célula ósea más abundante (más del 95% del total) y es la que tiene la vida media más larga, ya que puede durar más de 25 años.

Durante muchos años se creyó que el osteocito era una célula inactiva, ya que permanecía en el interior de la laguna osteoplásmica mineralizada y no era capaz de movilizarse ni de reproducirse. Sin embargo, actualmente sabemos que es la célula que dirige el proceso de remodelado óseo, estimulando tanto la reabsorción mediada por los osteoclastos, como la formación llevada a cabo por los osteoblastos. Las células del linaje osteoblástico sintetizan RANKL (ligando del receptor activador del factor nuclear kappa B), que se une al RANK (receptor activador del factor nuclear kappa B) del osteoclasto, estimulando la osteoclastogénesis y la función de los osteoclastos. Pero, además, sintetizan OPG (osteoprotegerina), receptor señuelo que

es capaz de unirse al RANKL, bloqueando su unión al RANK e impidiendo la activación de los osteoclastos. Se sabe que el RANKL del osteocito es más importante que el RANKL del osteoblasto en la regulación de los osteoclastos (Xiong y cols, 2014).

Además, el osteocito, rodeado de fluido óseo dentro de la laguna osteoplásmica, es capaz de detectar las variaciones mecánicas de las cargas y transformarlas en señales químicas, que estimularán a los osteoblastos o a los osteoclastos. A este fenómeno se le denomina mecanotransducción. Se sabe que los osteocitos se encuentran interconectados a través de las terminaciones plasmáticas que penetran en los conductos calcóforos. De esta forma conectan con los osteoblastos y con los osteoclastos de la superficie y con los vasos sanguíneos. Además, el osteocito maduro es capaz de sintetizar esclerostina, glicoproteína que regula negativamente la formación ósea a través de la inhibición de la señalización de la Wnt/ β -catenina, que favorece la formación ósea. Se sabe que las cargas mecánicas sobre el hueso y la hormona paratiroidea (PTH) inhiben la síntesis de esclerostina, aumentando la formación, mientras que la falta de carga la estimula, aumentando la reabsorción. De esta manera, se puede afirmar que la integridad de los injertos está influenciada por el estrés mecánico y que la ausencia de carga lleva al injerto a la reabsorción en vez de promover el remodelado, debido a la secreción de esclerostina por el osteocito.

Asimismo, el osteocito es capaz de detectar el microdaño e inducir la apoptosis de los osteocitos vecinos, favoreciendo la reabsorción del hueso dañado e induciendo la formación de hueso nuevo. De esta forma, el osteocito es capaz de reparar el microdaño y de renovar el tejido dañado o viejo.

Además, el osteocito tiene un papel importante en la regulación de la homeostasis fosfocálcica, ya que, por un lado, es capaz de reabsorber su propia laguna (fenómeno

llamado osteólisis osteocítica) en condiciones de grandes demandas de calcio, como puede ser durante la lactancia, para facilitar la liberación de calcio y fósforo a la circulación sanguínea; y, por otro lado, el osteocito sintetiza una proteína que no actúa sobre el hueso, pero actúa de forma endocrina sobre el riñón, regulando el metabolismo del fosfato; es el FGF-23 (factor de crecimiento 23). Este factor se libera desde el osteocito en respuesta a un exceso de fosfato en sangre, que sería tóxico para el organismo y actúa sobre el riñón favoreciendo la eliminación renal de fosfato.

La viabilidad de la red osteocítica es una característica fundamental para el éxito de los injertos autólogos (Guillaume et al, 2009). De hecho, esta red se altera con la edad y con la osteoporosis. Al microscopio óptico se puede observar que el hueso alogénico posee lagunas osteocíticas vacías, que además, observadas al microscopio electrónico de barrido se ven más mineralizadas, lo que se conoce como micropetrosis. Uno de los signos de incorporación de los injertos es que estas lagunas osteocíticas vacías se llenan con osteocitos vivos y se forma hueso vital por encima de las antiguas trabéculas.

III. JUSTIFICACIÓN

En base a las posibles similitudes del hueso alogénico con el autólogo, y en aras de buscar una alternativa predecible al mismo, con menor morbilidad, menos complicaciones y un mayor grado de aceptación de los pacientes, hemos diseñado el presente proyecto de tesis doctoral que consta de tres estudios independientes, cada uno con su hipótesis y objetivos específicos, a fin de aumentar los conocimientos actuales sobre los aloinjertos y sus mecanismos biológicos. Para ello hemos planteado dos ensayos clínicos, uno que compara dos tipos de aloinjerto en términos de reabsorción, así como variables que afectan a la misma, y otro que evalúa la influencia de la decorticación en la regeneración del maxilar con aloinjertos en bloque esponjosos, siendo ambos pioneros en su campo, ya que no existen estudios clínicos publicados con el mismo diseño. Finalmente, el estudio de revisión del papel del osteocito ayuda a comprender el comportamiento clínico, reabsorción y remodelado de estos injertos a nivel celular.

IV. HIPÓTESIS

A partir de las consideraciones previamente mencionadas, la hipótesis general de la presente tesis doctoral es que los aloinjertos en bloque son una alternativa terapéutica válida y predecible para la regeneración horizontal.

Considerando cada estudio por separado, la hipótesis de trabajo del estudio 1 es que los aloinjertos (FDBA) córtico-esponjosos presentan una menor tasa de reabsorción que los esponjosos. Además, existen múltiples factores que pueden afectar a esta reabsorción, como una baja densidad del lecho receptor o el hábito tabáquico; siendo la hipótesis alternativa que el grupo que recibió los aloinjertos córtico-esponjosos presentará una

menor tasa de reabsorción; y el tabaco y una baja densidad del lecho receptor contribuyen a una mayor tasa de reabsorción.

La hipótesis de trabajo del estudio 2 es que los aloinjertos (FDBA) esponjosos presentan una mayor neoformación ósea y mayor número de vasos sanguíneos cuando se realizan perforaciones de la cortical del lecho receptor en maxilar; siendo la hipótesis alternativa que el grupo que recibió las perforaciones presentará mayor porcentaje de hueso neoformado y mayor número de vasos sanguíneos.

En cuanto al último estudio, la hipótesis nula sería que el osteocito no desempeña un papel importante en el remodelado óseo.

V. OBJETIVOS

Objetivos generales

El objetivo general del primer estudio es evaluar los diferentes factores que influyen en la reabsorción de los bloques alogénicos y comparar en estos términos dos bloques con diferente arquitectura (esponjoso y córtico-esponjoso).

En el segundo estudio el objetivo general es evaluar la neoformación ósea, arquitectura y angiogénesis de los bloques de hueso alogénico en el maxilar, habiendo realizado previamente una serie de perforaciones en la cortical del área que va a recibir el injerto, mediante análisis histomorfométrico e inmunohistoquímico, comparando con el grupo sin perforaciones, midiendo el número de vasos por mm², hueso neoformado, remanente del injerto, tejido conectivo y tejido mineralizado.

El objetivo del tercer estudio es esclarecer el papel del osteocito en el remodelado óseo, en especial en lo relacionado con la mecanotransducción y la neoformación ósea.

Objetivos específicos

1. Evaluar la influencia de diferentes variables demográficas sobre la reabsorción de bloques esponjosos y córtico-esponjosos (edad, género, hábito tabáquico)
2. Evaluar el éxito clínico de los injertos en todos los grupos, mediante la resistencia a la separación durante la fase de colocación de implantes. Esta resistencia se medirá traccionando del injerto con un escoplo desde la zona del lecho receptor, a fin de observar si está correctamente incorporado.
3. Comparar los bloques alogénicos (FDBA) esponjosos y córtico-esponjosos en cuanto a su reabsorción.

4. Evaluar la influencia de la densidad ósea del lecho receptor en la reabsorción temprana del bloque.
5. Evaluar el efecto de las perforaciones del lecho receptor en la microarquitectura de los bloques esponjosos mediante micro TC, midiendo los parámetros volumen óseo (BV/TV), número, grosor y separación de trabéculas (T.N, T.Th, T.S).
6. Estudiar la supervivencia de los implantes colocados en este hueso regenerado a los 2 años. Teniendo en cuenta los parámetros del último World Workshop (Berglundh et al, 2018). Se medirá profundidad y sangrado al sondaje, y pérdida ósea marginal.

VI. MATERIAL Y MÉTODO. RESULTADOS

Tanto la descripción del material y método como de los resultados de los estudios han sido publicados como artículos científicos independientes:

Artículo 1

Tresguerres, F.G.F., Cortes, A.R.G., Hernandez, G., Cabrejos-Azama, J., Tamimi, F., Torres, J. (2019) “Clinical and radiographic outcomes of allogeneic block grafts for maxillary lateral ridge augmentation: a randomized clinical trial”. *Clinical Implant Dentistry and Related Research*; 21(5):1087-1098. doi: 10.1111/cid.12834.

Artículo 2



Tresguerres, F.G.F., Tresguerres, I., Iglesias, O., Leco, I., Tamimi, F., Torres, J. (2021) “The role of cortical perforations in allogeneic block grafting for lateral augmentation in

maxilla. A randomized clinical trial”. *Clinical Implant Dentistry and Related Research*; 23(4):530-542. doi: 10.1111/cid.12996.

Artículo 3

Tresguerres, F.G.F., Torres, J., López-Quiles, J., Hernández, G., Vega, J.A., Tresguerres, I.F. (2020) “The osteocyte: A multifunctional cell within the bone”. *Ann Anat*; 227:151422. doi: 10.1016/j.aanat.2019.151422.

Clinical and radiographic outcomes of allogeneic block grafts for maxillary lateral ridge augmentation: A randomized clinical trial

Francisco G. F. Tresguerres DDS¹  | Arthur R. G. Cortes MD, PhD, DDS²  |
Gonzalo Hernandez Vallejo MD, PhD, DDS¹ | Jatsue Cabrejos-Azama MD, PhD, DDS¹ |
Faleh Tamimi MD, PhD, DDS³ | Jesusis Torres MD, PhD, DDS¹

¹Department of Dental Clinical Specialties, Faculty of Dentistry, Complutense University, Madrid, Spain

²Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Faculty of Dentistry, University of Sao Paulo, Brazil

³Faculty of Dentistry, McGill University, Montreal, Quebec

Correspondence

Francisco G.F. Tresguerres, Department of Dental Clinical Specialties, Faculty of Dentistry, Complutense University, Plaza Ramón y Cajal, s/n (Ciudad Universitaria), 28040, Madrid, Spain.
Email: frango09@ucm.es

Abstract





Background: A main drawback of bone block graft surgery is the resorption occurring in early stages of healing. To our knowledge, there are no studies comparing outcomes of freeze-dried bone allograft (FDBA) blocks with different architecture.

Purpose: The aim of this work was to investigate different factors that can affect graft resorption and to compare the resorption rates of two different types of allogeneic blocks, corticocancellous and cancellous.

Materials and Methods: A randomized clinical trial was designed. Twenty-eight patients referred for onlay bone augmentation prior to implant placement were included in the study. Preoperative computerized tomography (CT) was taken for all patients. Patients received FDBA blocks of either cancellous or corticocancellous bone obtained from the iliac crest. After a 4-month follow-up, postoperative CT was taken. Then, another surgery was performed, with the purpose to place dental implants. The aforementioned groups were compared for bone resorption and implant outcome using analysis of covariance (ANCOVA) and repeated ANOVA measures, respectively. Demographic data, trabecular bone density, and graft sites were also analyzed.

Results: A total of 93 implants were placed in the augmented bone sites over 28 patients. A 100% survival rate was achieved during a mean follow-up period of 24 months in both groups. Higher bone resorption rate was found with cancellous bone grafts (29.2% ± 2.6) compared with corticocancellous grafts (19.3% ± 2.3). Moreover, higher resorption rates in patients with lower bone density (<185 Hounsfield Units) (31.7% ± 3.1) and smokers (26.39% ± 2.3) were observed when compared with patients with higher bone density (>185 Hounsfield Units) (16.8% ± 2.1) and nonsmokers (22.1% ± 2.3), respectively.

The role of cortical perforations in allogeneic block grafting for lateral augmentation in maxilla: A randomized clinical trial

Francisco G. F. Tresguerres DDS¹  | Isabel F. Tresguerres MD, DDS, PhD¹  |
 Oscar Iglesias DDS¹ | Isabel Leco DDS, PhD¹ | Faleh Tamimi DDS, PhD²  |
 Jesús Torres DDS, PhD¹ 

¹Department of Dental Clinical Specialties, Faculty of Dentistry, Complutense University, Madrid, Spain

²Faculty of Dentistry, McGill University, Montreal, Quebec, Canada

Correspondence

Francisco G. F. Tresguerres, Department of Dental Clinical Specialties, Faculty of Dentistry, Complutense University, Plaza Ramón y Cajal, s/n (Ciudad Universitaria), 28040 Madrid, Spain.
 Email: frango09@ucm.es

Abstract

Background: The need of decortication on the recipient site remains unclear for bone regeneration. To our knowledge, there are no human clinical trials that studied the influence of decortication on cancellous allogeneic block grafting.

Purpose: The aim of the present study is to evaluate the influence of perforating the cortex of the recipient site on cancellous allogeneic block graft integration and revascularization in the maxilla.

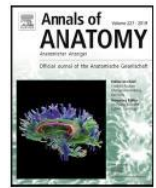
Material and Methods: Twenty-six patients referred for lateral bone augmentation were included in this clinical trial. Patients received freeze-dried bone allograft cancellous blocks obtained from the iliac crest; cortical perforations of the recipient bed were performed in the test group while in the control group it was left intact. After a 4-month healing period another surgery was performed to place dental implants, and a bone biopsy was collected using a trephine. All samples underwent micro-CT scans, and were processed for histomorphometric and immunohistochemical analysis. Implant survival comparisons were made using a repeated measures analysis of variance (ANOVA) while all other variables were compared using the analysis of covariance (ANCOVA).

Results: One hundred and nineteen implants were placed into 110 augmented sites. One hundred percent implant survival rate was reported during 24 months follow-up period. No differences were reported in bleeding on probing at 1 (5.6 vs 9%) and 2 years (13.2 vs 12.1%), probing pocket depth at 1 (3.4 ± 0.95 vs 3.6 ± 1.12 mm) and 2 years (3.8 ± 1.02 vs 4.1 ± 1.46 mm), and marginal bone loss at 1 (0.2 ± 0.52 vs 0.3 ± 0.57 mm) and 2 years (0.6 ± 0.91 vs 0.5 ± 0.87 mm). No statistically significant differences were found in the micro-CT and histomorphometric analysis in terms of newly formed bone ($25.7 \pm 11.2\%$ vs $22.3 \pm 9.7\%$), soft tissue ($33.0 \pm 14.7\%$ vs $36.5 \pm 15.7\%$), remnant allograft ($39.3 \pm 20.4\%$ vs $41.2 \pm 22.7\%$), and bone mineralization ($57.2 \pm 10.6\%$ vs $53.8 \pm 8.7\%$). Perforating the cortex of the recipient site had no significant effect on angiogenesis as shown by immunohistochemical analysis of CD34 positive blood vessels ($39.21 \pm 10.53/\text{mm}^2$ vs $34.16 \pm 12.67/\text{mm}^2$).



Contents lists available at ScienceDirect

Annals of Anatomy

journal homepage: www.elsevier.com/locate/aanat

The osteocyte: A multifunctional cell within the bone

F.G.F. Tresguerres^a, J. Torres^a, J. López-Quiles^a, G. Hernández^a, J.A. Vega^{b,c},
I.F. Tresguerres^{a,*}^a Dental Clinical Specialities Department, Faculty of Dentistry, Complutense University, Madrid, Spain^b Department of Morphology and Cellular Biology, Faculty of Medicine, Oviedo University, Oviedo, Spain^c Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma de Chile, Santiago de Chile, Chile

ARTICLE INFO

Article history:

Received 15 April 2017

Received in revised form 9 January 2019

Accepted 16 September 2019

Keywords:

Osteocyte

Bone remodeling

Sclerostin

FGF-23

ABSTRACT

The knowledge of bone biology has largely changed in the last few decades. Osteocytes are multifunctional bone cells that are surrounded by mineralized bone matrix and for decades it was considered that they might be relatively inactive cells. However, nowadays it is known that osteocytes are highly active cells which are indispensable for the normal function of the skeleton, playing main roles in several physiological processes, both within and beyond the bone microenvironment. This review highlights and updates the current state of knowledge of the osteocyte and focuses on its roles in bone remodeling and mineral homeostasis, and also reviews its recently discovered endocrine function. Osteocytes secrete sclerostin (a protein that works as a negative regulator of bone mass), and FGF-23, the most important osteocyte-secreted endocrine factor, since it is able to regulate the phosphate metabolism. Moreover, osteocytes can act as mechanosensory cells, transforming the mechanical strain into chemical signaling towards the effector cells (osteoblasts and osteoclasts). Therefore, the osteocyte plays an important role in bone biology, specifically in the remodeling process, since it regulates both the osteoblast and osteoclast activity.

Finally, the paper discusses the clinical application of the bone biology, updating the new therapies against bone-loss disorders.

© 2019 Elsevier GmbH. All rights reserved.

Contents

1. Introduction	2
1.1. The osteocytes network	2
1.2. Osteocyte differentiation	3
1.3. Osteocyte roles	3
1.3.1. Osteocytes are regulators of bone formation	3
1.3.2. Osteocytes are inducers of bone resorption	3
1.3.3. Osteocytes are a source of plasma calcium	4
1.3.4. Osteocytes are mechanosensory cells	5

Abbreviations: BMU, bone multicellular unit; PTH, parathyroid hormone; GH, growth hormone; IGF-I, insulin-like growth factor-I; TGF- β , transforming growth factor- β ; PGE₂, prostaglandin E₂; NO, nitric oxide; IL1, interleukin-1; IL-6, interleukin-6; TNF- α , Tumour necrosis factor- α ; rankl, receptor activator of nuclear factor kappa B (NF κ B) ligand; RANK, receptor activator of nuclear factor kappa B; OPG, osteoprotegerin; 1,25(OH)₂D₃, 1,25dihydroxy D₃ vitamin or calcitriol; MMP14, Matrix metalloproteinase-14; E11, E11 protein; LCS, lacuno-canalicular system; ATP, Adenosine triphosphate; Cx43, Connexin 43; COL-I, collagen I; RUNX2, runt-related transcription factor 2; OCN, osteocalcin; OPN, osteopontin; ALP, alkaline phosphatase; CD44, CD44 protein; DMP-1, dentin matrix protein-1; FGF, 23-fibroblastic growth factor-23; MEPE, matrix extracellular phosphoglycoprotein; PHEX, Phosphate Regulating Neutral Endopeptidase on Chromosome X; Wnt, Wingless protein; Dkk1, Dkkopf protein-1; LRP5/6, low density lipoprotein receptor 5 and 6; CSF-1, Colony Stimulating Factor-1; MCSF, Macrophage Colony Stimulating Factor; PTHR1, PTH receptor 1; PTHrP, PTH related peptide; BMD, bone mineral density; TRAP, tartrate-resistant acid phosphatase; VEGF, vascular endothelial growth factor; FDA, Food and Drug Administration; EMA, European Medicines Agency.

* Corresponding author at: Dental Clinical Specialities Department, Faculty of Dentistry, Complutense University, Plaza Ramón y Cajal s/n, 28040, Madrid, Spain.

E-mail address: isabelle@ucm.es (I.F. Tresguerres).

<https://doi.org/10.1016/j.aanat.2019.151422>

0940-9602/© 2019 Elsevier GmbH. All rights reserved.

VII. DISCUSIÓN

Los resultados del presente trabajo muestran una alta efectividad clínica de los aloinjertos en bloque, por lo que podrían ser una alternativa válida frente al uso de los autoinjertos.

1. Comparación entre aloinjertos y autoinjertos

Tradicionalmente, se ha atribuido a los aloinjertos una más lenta incorporación y revascularización en comparación con los injertos autólogos, debido en gran parte a la respuesta inmune, que se produce en las dos primeras semanas, mediada por linfocitos y macrófagos. Esta reacción inmunológica podría inhibir la osteoinducción mediada por los factores de crecimiento, así como la neo-angiogenesis debido a la presencia de células inflamatorias, y podría durar más o menos tiempo, en función del grado de histocompatibilidad del donante y receptor, siendo más agresiva en los injertos sin procesar (FFB) que en los liofilizados (Khan y cols. 2005). Sin embargo, en el estudio de Spin-Neto (Spin-Neto y cols, 2013) que se centra en evaluar esta respuesta inmunológica en aloinjertos sin procesar (FFB), no encontró diferencias estadísticamente significativas en comparación con autoinjertos a distintos tiempos. Evaluaron los niveles sistémicos de interleuquina 10 (IL-10), interleuquina 1 β (IL-1 β), interferón gamma (IFN- γ) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) en el día de la cirugía, y a 14, 30, 60 y 90 días, sin encontrar diferencias entre ambos grupos. Tampoco encontraron diferencias entre los distintos tiempos en cuanto a IL-10 e IL-1 β , pero sí encontraron mayores concentraciones de TNF- α a los 90 y 180 días comparando con el *baseline*, y a los 90 días en comparación con los 14 días; por último, el IFN- γ primero disminuyó desde el *baseline* a los 14 días, y aumentó desde los 14 a los 90 y 180 días. Estos resultados muestran que no hay una mayor reacción inflamatoria inmunológica en los aloinjertos sin procesar en comparación con los autólogos, lo que sería extrapolable a los injertos procesados usados en este

trabajo (FDBA), por lo que no interferiría con el proceso de incorporación y revascularización.

Los injertos autólogos se siguen considerando el *gold standard* debido a su potencial osteogénico y a su mayor predictibilidad en términos de integración. Por otra parte, presentan una serie de limitaciones, siendo reseñable el posible daño nervioso durante la obtención del injerto; a este respecto, Nkenke y colaboradores (Nkenke y cols. 2001) encontraron alteraciones sensoriales del nervio dentario inferior hasta 12 meses después de la obtención del injerto de sínfisis mandibular y en otro artículo Clavero y Lundgren (Clavero & Lundgren 2003) documentaron que la mitad de los pacientes incluidos en su estudio, a los que se les obtuvo un bloque autólogo de la línea oblicua externa o sínfisis mandibular, presentaron alteraciones nerviosas permanentes de la zona mentoniana. Otras posibles complicaciones son el daño a los dientes adyacentes de la zona de obtención, como necrosis, recesiones gingivales o fracturas; así como un mayor dolor e inflamación postoperatorios. Respecto a las zonas donantes extraorales, las posibles complicaciones pueden ser de mayor gravedad, como en los casos de obtención de calota, tibia o cresta iliaca, además de requerir en muchas ocasiones la hospitalización y anestesia general del paciente, aumentando las molestias postoperatorias y el coste de la cirugía.

Otra limitación de los autoinjertos es su alta tasa de reabsorción; en el ensayo clínico de Widmark y colaboradores (Widmark y cols. 1997), donde utilizaron injertos en bloque obtenidos de la mandíbula para regenerar horizontalmente el maxilar, describen una tasa de reabsorción del 60%. Por otra parte, la tasa de reabsorción de los aloinjertos es muy variable en la literatura, reportando algunos estudios un $10 \pm 10\%$ (Nissan y cols. 2011), hasta un $52 \pm 25.97\%$ (Lumetti y cols. 2014b). Sin embargo, en la revisión sistemática de Monje y su equipo de investigación (Monje y cols. 2014), se describe una media de reabsorción relativamente baja en estos injertos ($21.70 \pm 30.55\%$); además, reportan una

ganancia media de 4.79 mm en sentido horizontal y 2 mm en sentido vertical con este tipo de bloques, lo que es comparable a los resultados obtenidos con autoinjertos; es más, en otra revisión sistemática reciente (Starch-Jensen y cols. 2020), se reportan tasas muy similares con ambos tipos de injertos en estudios comparativos, encontrando una ganancia de 5.2 mm y 5.2 mm a los 6 y 12 meses en aloinjertos, y de 5.2 mm y 5.1 mm a los 6 y 12 meses en autoinjertos; y describe una reabsorción media de 4.4% y 4.8% a los 6 y 12 meses en aloinjertos, y de 5.3% y 6.3% a los 6 y 12 meses en autoinjertos, sin encontrar diferencias entre ambos; esta revisión concluye que no hay diferencias entre ambos injertos en términos de ganancia ósea y reabsorción, pero pone de manifiesto que el índice de complicaciones es mayor en el caso de los aloinjertos en estudios no comparativos, pudiendo deberse a métodos de evaluación dispares, distintos tiempos de seguimiento o por factores de confusión en la metodología.

A la vista de estos resultados podemos plantear que los bloques alogénicos tienen un comportamiento clínico similar a los autólogos, sin tener las limitaciones que estos presentan. Sin embargo, la gran variabilidad de los resultados en los estudios pone de manifiesto la necesidad de llevar a cabo más ensayos clínicos con una metodología homogénea para confirmar esta hipótesis, ya que la mayoría de estudios publicados son casos o series de casos.

2. Biología de los injertos alogénicos

El éxito de los injertos alogénicos depende de múltiples factores, que clásicamente han englobado la microestructura del injerto, la fijación del mismo y el correcto manejo de los tejidos blandos, otorgando mucha importancia a las condiciones de la zona receptora

y la necesidad del aporte sanguíneo, pudiendo igualmente condicionar el resultado las condiciones sistémicas del paciente (Aalam y cols, 2007; Khan y cols, 2005).

Sin embargo, en los últimos años, se han descubierto otros factores que actúan a nivel molecular y celular, que explicarían el buen comportamiento de los injertos alogénicos. Así se sabe que los injertos alogénicos no se reconocen como un cuerpo extraño por las células inmunes, sino que el organismo lo reconoce como propio e intenta regenerarlo, por lo que el comportamiento del aloinjerto no difiere mucho del autoinjerto (Lafzi y cols, 2016).

Además, los injertos alogénicos proporcionan una matriz extracelular que actualmente se sabe que juega un papel importante en la regeneración ósea. La matriz mineralizada extracelular del tejido óseo está formada en un 60% por componentes inorgánicos, como trazas de iones metálicos (Mg, Zn, Sr, Cu, Co...) o hidroxapatita cálcica poco cristalizada, y un 40% de elementos orgánicos, siendo el 90% colágeno tipo I, y el otro 10% proteínas no colágenas como osteopontina (glicoproteína), osteocalcina (con ácido gamma carboxiglutámico), proteoglicanos (decorina y biglicano), glicosaminoglicanos (condroitín sulfato y ácido hialurónico) y factores de crecimiento como las BMP o el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) (Mansour y cols. 2017).

La matriz extracelular constituye un ambiente rico en información biológica, con proteínas que además de ser estructurales regulan la migración, proliferación y diferenciación celular. Así la estructura de matriz se ve influenciada por los componentes de la misma.

Como hemos mencionado anteriormente, la mayoría de las células de un injerto autólogo no sobreviven a la toma del injerto (solo persisten alrededor del 10%) (Mansour y cols, 2017); sin embargo, este tipo de injerto presenta unas excelentes propiedades

regenerativas debido a que mantiene su matriz mineralizada extracelular. Los aloinjertos no presentan células vivas, pero también mantienen su matriz mineralizada extracelular; por ello se sugiere que los resultados clínicos de injertos autólogos y homólogos son parecidos. Esta matriz mineralizada juega un papel crucial en la regeneración ósea, ya que se ha observado cómo biomateriales sintéticos, cuya composición y propiedades emulan a ciertos componentes de la matriz mineralizada tienen un gran potencial regenerativo; como por ejemplo los glicosaminoglicanos y péptidos autoensamblantes (Boskey 2013).

Además, en los últimos años, se ha descubierto que los macrófagos juegan un papel importante en la cicatrización de los tejidos, y, especialmente, del hueso. Pueden ser macrófagos M1 o pro-inflamatorios y macrófagos M2 o anti-inflamatorios y pro-regenerativos. Estudios recientes sugieren que uno de los factores que influyen en el mantenimiento a largo plazo del tejido óseo peri-implantario puede ser la existencia de macrófagos M2 en la interfase hueso-implante (Amengual-Peñafiel y cols 2019) y que los aloinjertos promueven la aparición de macrófagos M2, que se asocian con una correcta cicatrización de los tejidos (Mansour y cols, 2019). Mientras que los M1 liberan citoquinas proinflamatorias como interleucinas (IL-1b, IL-6, IL-12) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), los M2 liberan citoquinas antiinflamatorias como IL-4 o IL-10, señales osteogénicas, como el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) o la proteína morfogénica ósea 2 (BMP-2), y factores angiogénicos, como el vascular endotelial (VEGF) o el derivado de las plaquetas (PDGF). Por todo ello juegan un papel esencial en el remodelado, angiogénesis y el proceso de regeneración (Sheikh y cols, 2015; Badylak & Gilbert 2008; Wang y cols, 2017).

3. Microarquitectura del injerto

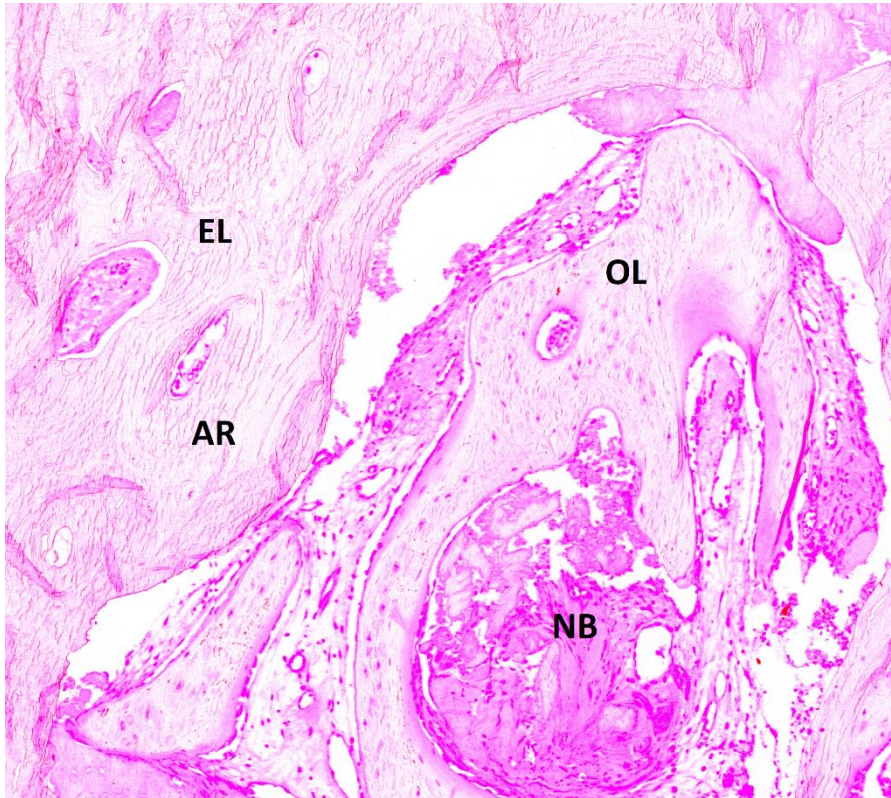
La microarquitectura del injerto es un factor clave para su incorporación y revascularización, y está íntimamente relacionada con su tasa de reabsorción (Ozaki & Buchman. 1998; Ozaki y cols. 1999). Respecto al mantenimiento del volumen del injerto, se ha sugerido durante años que el origen embriológico era el factor más determinante al respecto, siendo la tasa de reabsorción menor en los injertos de origen intramembranoso que en los de origen endocondral, pero no se ha encontrado una justificación biológica plausible. La hipótesis planteada por los autores previamente citados, es que es la cantidad de hueso cortical y trabecular del injerto lo que va a determinar su reabsorción, y justifican que se haya encontrado mayor reabsorción en los de origen endocondral porque estos normalmente presentan un mayor componente esponjoso y una menor cortical que los de origen intramembranoso, que suelen presentar mucho más hueso cortical. Estas diferencias en su composición, no inherentes al origen embriológico, es lo que determina las diferencias en la supervivencia y los patrones de reabsorción; y así lo describen en su estudio con injertos en bloque onlay autólogos en conejos Nueva Zelanda Ozaki y Buchman (Ozaki & Buchman. 1998), en el que dividen los injertos de origen endocondral en sus dos componentes (injertos cortical y esponjoso) y los comparan con injertos corticales de origen intramembranoso; no se encontraron diferencias al comparar ambos bloques corticales, pero sí encontraron menor reabsorción en ambos respecto al esponjoso. Resultados que concuerdan con los de nuestro estudio, donde se encontró más reabsorción en los bloques esponjosos en comparación con los córtico-esponjosos.

Una teoría que explica las elevadas tasas de reabsorción de los injertos en bloque onlay es el concepto de "*biological boundaries*" propuesto por Whitaker (Whitaker 1998); esta teoría establece que los tejidos blandos tienen una forma predeterminada, que tiende a permanecer constante, y es lo que delimita el crecimiento óseo; por lo tanto, cuando se

coloca un injerto onlay estos límites marcados por el tejido blando se ven alterados, lo que desencadena una respuesta homeostática que consiste en provocar incremento de las fuerzas musculares en la zona del injerto, induciendo así su reabsorción (Oppenheimer y cols. 2008).

La hipótesis que barajamos es que el patrón de reabsorción depende directamente de la revascularización y neoformación ósea del bloque, siendo de gran importancia la presencia de osteocitos en la capa más superficial del bloque, que es la que recibe las fuerzas musculares, y una de las funciones de los osteocitos es la mecanotransducción, es decir, transformar estos estímulos mecánicos en señales químicas que desencadenen el proceso de reabsorción o formación. A este respecto, sabemos que el patrón de revascularización del hueso esponjoso difiere mucho del cortical; el injerto esponjoso se revasculariza rápidamente, ya que los vasos sanguíneos penetran en él fácilmente a través de los espacios intertrabeculares, estos vasos depositan a su alrededor células osteoprogenitoras que se diferencian a osteoblastos dando lugar a hueso neoformado rodeando estos vasos sanguíneos, y el aloinjerto cercano a este hueso neoformado puede contener osteocitos vivos en sus lagunas, como observamos en las imágenes histológicas de nuestro estudio (Figura 1), por lo que será un tejido sensible a la mecanotransducción; por el contrario, el hueso cortical presenta una estructura densa y difícilmente penetrable para los nuevos vasos sanguíneos, que deben usar los canales preexistentes (canales de Havers y Volkmann) para llegar al injerto; esto ocurre de manera mucho más lenta que en los esponjosos, ya que para que los vasos atravesen estos canales preexistentes primero debe haber actividad osteoclástica que los ensanche, y, en muchas ocasiones, la revascularización no llega a ser completa, por lo que este injerto cortical sin revascularizar no va a presentar osteocitos vivos, lo que unido a su estructura densa y firme lo hace menos susceptible a sufrir reabsorción debida a las fuerzas musculares.

Figura 1



Tinción con fucsina básica mostrando el proceso de sustitución de estos injertos (x10). Se puede apreciar como el hueso neoformado se encuentra en los espacios intertrabeculares, donde primero penetran los vasos sanguíneos, y como las zonas del aloinjerto remanente cercanas a este hueso neoformado presentan osteocitos vitales en sus lagunas, mientras que las más alejadas tienen las lagunas vacías. EL: Empty lacuna. AR: allograft remnant. NB: newly formed bone. OL: osteocytes present in lacuna

Por último, los injertos córtico-esponjosos combinan las propiedades de ambos, ya que el hueso esponjoso en íntimo contacto con el lecho receptor se revasculariza rápidamente y de forma completa, mientras que la capa externa cortical actúa como barrera frente a la reabsorción temprana, con el inconveniente de que esa parte del aloinjerto puede tardar meses o años en reemplazarse por hueso neoformado, lo que puede ocasionar

complicaciones como las observadas en tres estudios clínicos en humanos con bloques córtico-esponjosos frescos congelados (Chiapasco y cols. 2015a; Chiapasco y cols. 2015b; Spin-Neto y cols. 2014), en los que se describe un alto riesgo de fracaso del injerto, reportando altas tasas de dehiscencias, exposición y secuestro del bloque tras la colocación de implantes a los 4-5 meses de la cirugía regenerativa, debido principalmente a una inadecuada revascularización del injerto. Sin embargo, estas complicaciones no se observaron en ningún caso de nuestro estudio.

En definitiva, coincidimos con la hipótesis de que la reabsorción y el remodelado del bloque depende directamente de la arquitectura del mismo y no del origen embriológico, siendo esta tasa mayor en los bloques esponjosos. Aunque trabajos previos reportan tasas de reabsorción menores a las observadas en nuestro estudio de bloques esponjosos, encontrando alrededor de un 5% de reabsorción a los 6 meses (Nissan y cols. 2011; Nissan y cols. 2012), nuestro estudio es el primer ensayo clínico comparativo entre bloques FDDBA de distinta arquitectura.

4. Densidad del lecho receptor y reabsorción del injerto

Desde la introducción de los implantes por Branemark (1985) muchos autores han tratado de evaluar la morfología, calidad y densidad del tejido óseo como un factor predictor del éxito del tratamiento con implantes (Lekholm & Zarb 1985), sugiriendo que aquellos huesos con menor densidad, como la zona posterior del maxilar, son de peor calidad y se relacionan con un mayor fracaso de implantes que aquellos más densos como la mandíbula. En este sentido, varios estudios reportan una mayor tasa de fracaso de implantes en huesos con una baja densidad (Jaffin y cols. 1991; Esposito y cols. 1998; Jemt y cols. 1992). Para evaluar esta calidad y densidad ósea existen varios métodos,

como la histomorfometría de biopsias óseas (Thomsen y cols. 1998), densitometría (Devlin y cols. 1998), análisis digital de micro radiografías (Jager y cols. 1990) y ultrasonidos (Hans y cols. 1996); estas técnicas suponen un método fiable para la evaluación de la densidad ósea, pero resultan poco útiles para la práctica clínica habitual. La técnica más utilizada es la tomografía computarizada (TC), que fue introducida en implantología por Schwarz (Schwarz y cols. 1989), y que se basa en una correlación entre el tono de gris del pixel del escáner, expresado como Unidades Hounsfield (UH) y la densidad ósea. Esta técnica ha sufrido grandes avances con el paso de los años, cada vez se empleaba una menor dosis de radiación, hasta la aparición de la tomografía computarizada de haz cónico (CBCT), que es la más empleada hoy en día, dado que la dosis de radiación es muy baja, y su desarrollo permite la visualización de las diferentes estructuras de la cavidad oral en alta definición, y permite evaluar la calidad y densidad ósea. No obstante, si se quiere realizar un análisis cuantitativo de estas Unidades Hounsfield el TC presenta una mayor precisión respecto al CBCT, debido a la gran variabilidad en los tonos de gris que muestran los CBCT (Pauwels y cols. 2015). Por ello, para el presente trabajo se optó por realizar un TC a los pacientes y así obtener datos fiables respecto a la densidad ósea del lecho receptor.

En este aspecto, se han propuesto varias clasificaciones en función de las Unidades Hounsfield. Tomando como referencia una modificación de la clasificación de Misch (Norton & Gamble. 2002), podemos considerar el hueso menor a 500 UH como tipo 4, y el hueso entre 500 y 850 como tipo 2-3. Es en estos huesos tipo 4 donde se ha reportado mayor fracaso en los implantes, pudiendo ser debido principalmente a la falta de estabilidad primaria.

Nuestro estudio es el primero que pone de manifiesto la relación entre la baja densidad del lecho receptor y una mayor tasa de reabsorción, ya que en aquellos lechos receptores

con densidad <185 UH se encontró una mayor reabsorción de los bloques, independientemente de la microarquitectura del injerto. Esto podría deberse a que el tejido óseo de baja densidad se ha relacionado con una menor expresión de marcadores y genes osteoblásticos, como RUNX2, Osterix, WNT10B y Osteocalcina y una mayor expresión de marcadores y genes osteoclásticos, como una mayor proporción de RANKL respecto a la Osteoprotegerina (ratio RANKL/OPG), esclerostina, y un incremento en los niveles de las enzimas superóxido dismutasa 2 (SOD2) y glutatión peroxidasa GPX3 (Föger-Samwald y cols. 2014; Föger-Samwald y cols,2016), lo cual puede promover una mayor reabsorción del injerto. En este sentido, en el estudio de Lumetti y colaboradores (Lumetti y cols. 2014a), se describió la relación entre la densidad del bloque alogénico (FFB) y la tasa de reabsorción, siendo esta mayor en injertos de baja densidad (<800 UH), lo que concuerda con el trabajo de Donovan y colegas (Donovan y cols. 1993) que describe menos reabsorción a mayor densidad del injerto autólogo; no obstante, nuestro estudio supone el primer ensayo clínico que describe la influencia de la densidad del hueso nativo en la reabsorción del injerto.

5. Edad del paciente

Con la edad, la capacidad regenerativa del hueso se va reduciendo, debido a un aumento de la reabsorción, a una disminución de la formación o a ambas. Por un lado, existe una reducción del potencial osteogénico de la médula ósea, debido al incremento del compartimento del tejido adiposo, en detrimento de las células osteoprogenitoras (Bolamperti et al, 2018). Además de disminuir la diferenciación osteoblástica, también se reduce su actividad y vida útil, así como aumenta el índice de apoptosis de los osteoblastos y osteocitos (Kasper y cols. 2009); y además se ha observado un aumento de la osteoclastogénesis con la edad (Chan & Duque 2002). Por otra parte, algunos estudios sugieren que las células endoteliales pueden jugar un papel clave en la proliferación y

diferenciación osteoblástica, y que existe una correlación negativa entre la edad y la cantidad y actividad de estas células endoteliales (Zhou y cols. 2008).

Respecto a los bloques alogénicos, Nissan y colaboradores (Nissan y cols 2012) en un estudio histomorfométrico con bloques esponjosos (FDBA) en maxilar, encontraron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la neoformación ósea y remanente del injerto a favor de los pacientes más jóvenes (<40 años), sin encontrar diferencias en el porcentaje de médula o tejido conectivo, postulando que la neoformación ósea, y el proceso de *creeping substitution* depende directamente de la edad.

En los dos ensayos clínicos del presente trabajo se estudió la edad como una covariable, a fin de evaluar si podría influenciar la reabsorción, neoformación ósea o angiogénesis de los injertos alogénicos. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la edad, porque la mayoría de los pacientes incluidos en ambos eran de edad media-avanzada (>60 años), considerándose como una de las limitaciones de los estudios. Se hace necesario realizar más estudios centrados en este factor para esclarecer su papel en la regeneración ósea con estos injertos.

6. Tabaco

El hábito tabáquico constituye un factor de riesgo para la enfermedad periodontal y la pérdida ósea periimplantaria. Muchos estudios ponen de manifiesto su papel en el fracaso de la osteointegración o en regeneraciones óseas. Por una parte, tiene un efecto vasoconstrictor, que repercute negativamente en los tejidos blandos y duros, aumentando el riesgo de dehiscencia de la herida y disminuyendo el aporte sanguíneo al injerto; por otro lado, la nicotina ha sido identificada como un modulador negativo de proteínas celulares implicadas en procesos patológicos; además un estudio reciente sugiere que el tabaco puede reducir la diferenciación osteoblástica de las células mesenquimales del

hueso alveolar, afectando directamente al proceso de osteointegración y favoreciendo la pérdida ósea marginal (Zhao y cols. 2018).

Los resultados de nuestro estudio relacionan el hábito tabáquico con una mayor tasa de reabsorción de los bloques alogénicos, lo que concuerda con otros estudios que lo relacionan con una peor cicatrización de tejidos blandos e injertos óseos (Levin y cols. 2013). Sin embargo, en el estudio de Ozkan y cols (Ozkan y cols, 2014), donde se analizó el proceso de cicatrización de un alveólo postextracción, estudiando la microarquitectura y composición de las fases orgánicas e inorgánicas del tejido óseo mediante micro TC y espectroscopia Raman, no se encontró ninguna diferencia en fumadores (más de 10 cigarrillos al día durante más de 10 años) comparando con no fumadores (nunca habían fumado), a diferencia de otros estudios *in vitro* que han demostrado un aumento de los biomarcadores inflamatorios y disminución de los marcadores de formación ósea (Campos y cols. 2015); se postula que la matriz mineralizada extracelular al ser una fuente productora de procesos biológicos, químicos y celulares es menos sensible a los efectos directos e indirectos del tabaco.

7. Decorticación en regeneración ósea

El rol que juega la decorticación en la regeneración ósea es hoy en día desconocido; nuestro estudio es el primero en evaluar su efecto en la regeneración horizontal con bloques alogénicos en maxilar.

Existen diferentes hipótesis de sus efectos beneficiosos para la regeneración, como:

1. Las perforaciones del hueso cortical pueden suponer una vía de entrada al injerto en bloque para vasos sanguíneos y células osteogénicas, además de promover el sangrado y la formación de un coágulo estable, mejorando su angiogénesis e incorporación, ya que a través de estas vías pueden llegar citoquinas, factores de

crecimiento y células osteoprogenitoras (Acar y cols. 2016; Danesh-Sani y cols. 2017).

2. La decorticación se puede contemplar como un estímulo nocivo que mejora la cicatrización ósea gracias al fenómeno de aceleración de la cicatrización regional descrito por Frost (Frost 1983).
3. La decorticación podría mejorar las propiedades de adhesión del bloque al lecho receptor, factor clave para su correcta incorporación, especialmente en aquellos bloques monocorticales (Delloye y cols. 2002; Adeyemo y cols. 2008) .

Por el contrario, existen otras hipótesis acerca de los efectos negativos de la decorticación, como una mayor pérdida sanguínea, mayor dolor e inflamación postoperatoria, mayor tiempo operatorio, incremento en la tasa de reabsorción o fibrosis del injerto (Greenstein y cols. 2009; Adeyemo y cols. 2008).

En nuestro estudio, las perforaciones corticales del lecho receptor no fueron capaces de mejorar la angiogénesis ni la neoformación ósea de los bloques esponjosos en maxilar. Nuestra hipótesis es que esto se debe a las características anatómicas y a la vascularización del hueso maxilar. El hueso maxilar presenta normalmente una cortical fina y un gran componente de hueso trabecular, a diferencia de la mandíbula, que normalmente presenta un mayor componente cortical, con una cortical externa de mayor grosor y densidad; esto va a suponer un factor clave en la revascularización del injerto, ya que como se ha comentado anteriormente, los vasos sanguíneos penetran con mayor facilidad el hueso trabecular que cortical. Por otra parte, el maxilar es un hueso altamente vascularizado, que recibe irrigación de un gran número de arterias, vasos y arteriolas, convergiendo la mayoría en los plexos endóstico, perióstico o periodontal, otorgando al maxilar su gran vascularización; adicionalmente, las arterias del macizo cráneo-facial y vasos sanguíneos del cráneo pueden dotar de aporte

sanguíneo a este hueso, mejorando su vascularización. Por lo que postulamos, que su fina cortical y gran aporte sanguíneo pueden hacer innecesarias las perforaciones del lecho receptor previa a la colocación del bloque en el hueso maxilar.

Existen múltiples estudios que no encuentran diferencias cuando comparan decorticación versus dejar el lecho intacto en regeneración ósea, pero la mayoría son en modelo animal.

Dayangac y colegas (Dayangac y cols, 2016) estudiaron injertos *onlay* mandibulares en cerdos, llevando a cabo un estudio a boca partida; y encontraron que la decorticación no mejoró la neoformación ósea ni alteró la actividad osteoblástica u osteoclástica; Además, encontraron una menor reabsorción en los casos en los que se mantuvo el lecho intacto en comparación con los que se realizaron perforaciones.

Danesh-Sani y colaboradores (Danesh-Sani y cols. 2017) llevaron a cabo un ensayo clínico en humanos centrado en la regeneración ósea guiada en mandíbula, utilizando un xenoinjerto bovino y membrana de colágeno, sin encontrar diferencias significativas en términos de hueso neoformado; pero sí describen un mayor número de vasos sanguíneos en el grupo al que se le realizaron las perforaciones a los 7 meses, lo que puede ser debido a la arquitectura cortical densa de la mandíbula. Adeyemo y colegas (Adeyemo y cols. 2008) describen que la decorticación no supuso una mejor incorporación de los injertos *onlay* mandibulares en ovejas, ya que no encontraron diferencias en su tasa de reabsorción, ni histológicas, ni en el número de osteoblastos y osteoclastos detectados mediante inmunohistoquímica.

Estos resultados concuerdan con los de otros estudios realizados en calota de conejo; como el realizado por Lundgren y colaboradores (Lundgren y cols. 2000), en el que estudian el efecto de la decorticación usando cilindros de titanio, y en el que no

encontraron diferencias en la formación ósea ni en las características morfológicas óseas entre ambos grupos a los 3 meses. En este sentido, Slotte y Lundgren (Slotte & Lundgren 2002) llevaron a cabo un estudio con un diseño muy similar en el mismo modelo, sin encontrar diferencias a favor de la decorticación en términos de ganancia ósea, altura de hueso neoformado en el cilindro, densidad ósea ni en el contacto hueso-titanio de las paredes del cilindro.

Por el contrario, otros estudios respaldan la efectividad de la decorticación. Como el llevado a cabo por Lee y cols. (Lee y cols. 2014) también en un modelo de calota de conejo, utilizando cilindros de titanio y con posterior colocación de un fosfato beta-tricálcico (TCP), reportando una mayor área de hueso neoformado a las 2 semanas en el grupo de la decorticación, pero sin encontrar diferencias en el análisis inmunohistoquímico de osteocalcina o VEGF. Majzoub y colaboradores (Majzoub y cols. 1999) realizaron un estudio similar a los anteriores, en calota de conejo y utilizando cilindros de titanio sin biomaterial, encontrando una mayor neoformación y densidad ósea a los 10, 21, 41 y 60 días; resultados que concuerdan con los de Pedrosa Jr y colegas (Pedrosa Jr y cols. 2009), quienes colocan injertos en bloque autólogos tipo *onlay* en la calota de conejos, y describen una mayor aposición ósea en la interfase lecho receptor-injerto en las etapas iniciales de cicatrización, lo que postulan que mejoraría su incorporación, así como menor reabsorción y mayores cantidades de VEGF, osteopontina (OPN), fosfatasa ácida tartrato-resistente (TRAP) y fosfatasa alcalina (ALP) en el grupo con perforaciones del lecho, sugiriendo que estas aumentan la actividad metabólica del hueso y favorecen la incorporación y revascularización del injerto. Además, en otro estudio con un diseño en calota de conejo y cilindros de titanio (Min y cols. 2007) se encontró mayor cantidad de

osteoblastos bajo los cilindros a los 3 meses, además de un mayor porcentaje de hueso neoformado y tejido mineralizado.

Por otra parte, otros autores sugieren la utilidad de perforar no solo el lecho receptor sino también el injerto. Delloye y colaboradores (Delloye y cols. 2002) realizaron un estudio con injertos en bloques alogénicos frescos congelados, en tibia de ovejas, en el que comparaban injertos con perforaciones contra injertos intactos y no encontraron diferencias en la evaluación de la incorporación del injerto con radiografías ni en la densidad ósea medida mediante densitometría; sin embargo, describen una mayor porosidad y mayor neoformación ósea en la cortical del aloinjerto en el grupo perforado. Adicionalmente, otro estudio que utiliza aloinjertos frescos congelados en bloque en un modelo cruzado de tibia de rata, comparando injertos perforados contra sin perforar, describe una mayor aposición de hueso trabecular, un mayor remodelado de la porción cortical del injerto, y una menor reabsorción en el grupo que recibió las perforaciones a las 20 semanas (Gordh y cols. 1997). Resultados que concuerdan con otros estudios que usan injertos autólogos en bloque en un modelo de fusión espinal en ratas, los cuales describen una mayor formación ósea y una mejora en la integración del bloque cuando este se perfora a las 9-10 semanas de cicatrización (Boden y cols. 1995; Canto y cols. 2008).

Se han descrito resultados similares en el modelo de perro. En el modelo de la fusión espinal se encontró una mejor incorporación del bloque a los 3 meses, sin encontrar diferencias a los 6 (Conti y cols. 2006). En el caso de injertos autólogos mandibulares, se reportó una mejor integración y cicatrización en los casos en los que los bloques y el lecho receptor habían recibido perforaciones (De Carvalho & Vasconcellos 2000). Mientras que otro grupo de investigación que realiza dos estudios, uno radiográfico y otro histológico, en un modelo de perro mongrel, utilizando bloques autólogos de

mandíbula en maxilar, describe que las perforaciones del bloque y el lecho receptor resultan en una mejor angiogénesis e incorporación en las etapas iniciales de la cicatrización, así como en un mejor mantenimiento del volumen del injerto; describiendo además cómo en el grupo en el que los bloques y el lecho receptor habían recibido perforaciones, el análisis histológico demostró un remodelado completo del mismo, mientras que en el grupo que se mantuvo intacto solo se encontró el remodelado en la interfase (Oh y cols. 2011; Cha y cols. 2011).

Finalmente, en la reciente revisión sistemática de Alvira-González y De Stavola (Alvira-González & De Stavola 2020), que se centra en el papel de las perforaciones en la regeneración ósea guiada y bloques autólogos, se concluye que la evidencia que justifica sus efectos positivos es muy limitada, encontrando resultados contradictorios en la literatura, poniendo de manifiesto la necesidad de llevar a cabo más estudios controlados en humanos para esclarecer su efecto.

Esta gran variabilidad entre los estudios consultados puede deberse las distintas características anatómicas y arquitectura del hueso que va a recibir el injerto/cilindro, ya que casi todos los estudios revisados se han llevado a cabo en modelo animal, sin describir la ratio de cortical-medular o grosor de la cortical externa, lo cual postulamos que es determinante para evaluar el efecto de las perforaciones; por ejemplo, muchos se han realizado en calota de conejo, que es un hueso muy cortical sin componente medular, lo cual puede enmascarar el efecto de la decorticación. Además, habría que tener en cuenta el tipo de injerto, ya que muchos estudios usan particulado bajo una membrana o cilindro de titanio, que tiene un patrón de revascularización distinto al de los injertos en bloque, ya que hay mayor neoformación de vasos entre las partículas del injerto; o la microarquitectura del injerto, en caso de los bloques, ya que algunos estudios emplean bloques mono-corticales cuya

revascularización ocurre mucho más despacio, y en ocasiones de forma incompleta, en comparación con los esponjosos.

En nuestro estudio no encontramos que la decorticación del lecho receptor mejore la angiogénesis ni la neoformación ósea de los bloques FDBA esponjosos. Creemos que esta ausencia de diferencias puede ser debido a la cortical externa de poco grosor que presenta habitualmente el hueso maxilar, a diferencia de la mandíbula; a la estructura esponjosa tanto de los bloques como del lecho receptor, que se revasculariza más rápidamente y contiene más células y vasos sanguíneos que el cortical (Khan y cols, 2005); a la excelente vascularización que tiene el hueso maxilar, complementada por las arterias y arteriolas craneo-faciales que llegan al paladar duro y blando; y porque un estímulo nocivo mínimo sobre el lecho receptor, como puede ser el despegamiento del periostio o la colocación de tornillos de osteosíntesis, podría desencadenar el proceso regenerativo (Greenstein y cols, 2009). Nos centramos únicamente en el maxilar porque la anatomía del mismo no tiene grandes variaciones anatómicas inter-individuos como la mandíbula, donde la ratio hueso cortical-hueso trabecular puede diferir mucho de un individuo a otro, así como el grosor de la cortical externa, en función de la edad, tiempo de edentulismo, fenotipo óseo, etc.

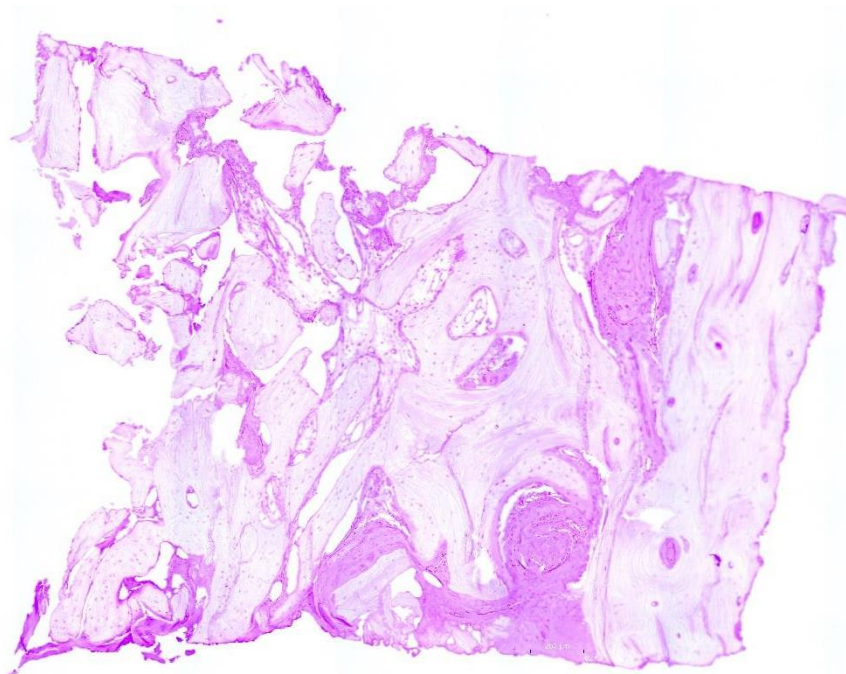
8. Análisis histomorfométrico e inmunohistoquímico

En nuestro segundo estudio analizamos histológicamente los injertos FDBA esponjosos, a fin de estudiar si la decorticación previa del lecho receptor incrementaba la neoformación ósea o la angiogénesis, sin encontrar diferencias entre ambos grupos.

Ya se ha descrito anteriormente el patrón de revascularización de estos injertos esponjosos, que ocurre de forma rápida y completa gracias a los grandes espacios

intertrabeculares; esto influye positivamente en la neoformación ósea y en el *creeping substitution process*, ya que son estos vasos los que transportan células osteogénicas, por lo que se forma el *woven bone* alrededor de ellos; en esta línea, existe cada vez más evidencia de que la angiogénesis y la osteogénesis son procesos vinculados y secuenciales (Galindo-Moreno y cols. 2010). Hemos podido observar cómo el hueso neoformado se encuentra rodeando a los vasos sanguíneos, y cómo el aloinjerto remanente cercano a este hueso neoformado tiene osteocitos vivos presentes en sus lagunas, a diferencia de las lagunas vacías sin osteocitos que existían inicialmente en el aloinjerto (Figura 2) por lo que podemos postular que este hueso ya es un tejido vital, que se va a comportar de manera similar al hueso prístino, siendo sensible a la mecanotransducción, y al remodelado, permitiendo la osteointegración de los implantes insertados en él.

Figura 2



Tinción con fucsina básica del grupo control del estudio 2 (x10). Se aprecian zonas del aloinjerto con osteocitos vitales presentes en sus lagunas.

Estudios previos describen resultados histomorfométricos similares a los observados en nuestro estudio. En este sentido, Deluiz y colaboradores (Deluiz y cols. 2017) realizaron un estudio histológico de bloques córtico-esponjosos frescos congelados (FFB) en 66 pacientes, encontrando una media de tejido mineralizado de $45.06 \pm 11.38\%$ a los 4 meses, y de $45.64 \pm 10.97\%$ a los 6 meses; a los 4 meses describen una media de hueso neoformado de $20.8 \pm 9.52\%$ y un $24.27 \pm 14.84\%$ de aloinjerto remanente, mientras que a los 6 meses encuentran una media de $27.2\% \pm 14.86$ de tejido óseo neoformado, y un $18.44 \pm 5.77\%$ de aloinjerto remanente; concluyen que ambos tiempos parecen adecuados para colocar los implantes tras la regeneración, ya que no se encontraron diferencias significativas entre ellos; sin embargo, sí se observó mayor reabsorción en el grupo de los 6 meses. Por todo ello, nuestro tiempo de espera para colocar los implantes tras la regeneración horizontal con estos bloques es de 4 meses. Adicionalmente, otro estudio realizado en bloques córtico-esponjosos FFB describe una media de $40.1 \pm 6.5\%$ de tejido mineralizado, $23.7 \pm 6.0\%$ de hueso neoformado, $16.4 \pm 1.5\%$ de aloinjerto remanente y $59.9 \pm 6.5\%$ de tejido conectivo a los 5-6 meses (Jun y cols. 2016).

En relación con los bloques esponjosos FDBA, los mismos que empleamos en nuestro estudio, Nissan y colaboradores (Nissan y cols. 2011), realizaron dos estudios histomorfométricos con este tipo de bloques; en uno, centrado en la zona posterior mandibular sobre 24 pacientes, encontraron una media de $44 \pm 28\%$ de hueso neoformado, $29 \pm 24\%$ de aloinjerto remanente y $27 \pm 21\%$ de tejido conectivo. Mientras que en el otro enfocado en la zona anterior del maxilar sobre 40 pacientes (Nissan y cols. 2012), describen una media de $33 \pm 18\%$ de hueso neoformado, $26 \pm 17\%$ de aloinjerto residual y $41 \pm 2\%$ de tejido conectivo. Los mayores porcentajes de hueso neoformado observados en estos dos estudios en comparación con el nuestro

se podrían explicar por el tiempo de cicatrización, que en estos dos ensayos clínicos fue de 6 meses mientras que en el nuestro fue de 4, y porque el *creeping substitution process* parece seguir una función lineal en el tiempo (Acocella y cols. 2012).

En cuanto a la angiogénesis, se ha mencionado anteriormente que es un factor indispensable para la regeneración ósea, ya que el tejido óseo precisa de aporte sanguíneo para la obtención de oxígeno y nutrientes, así como para eliminar el dióxido de carbono y otros residuos metabólicos (Marenzana & Arnett 2013), y en el caso de las regeneraciones con bloques, la red de vasos neoformados, además, va a suponer la conexión funcional entre el injerto y el lecho receptor, siendo clave en la neoformación ósea, supervivencia y reabsorción del mismo (Monje & Wang 2017).

Los vasos sanguíneos están compuestos de diferentes tipos celulares. La capa interna de estos vasos está formada por células endoteliales, las cuales están cubiertas en su superficie abluminal externa por células perivasculares, denominadas pericitos, que están en contacto directo con las células de los capilares endoteliales y vasculares (Armulik y cols. 2011). Los vasos sanguíneos pueden formarse a través de dos procesos: vasculogénesis y angiogénesis. El primero es la formación de vasos sanguíneos de *novο*, es decir, hace referencia a la neoformación de vasos a través de la migración de hemangioblastos, precursores embrionarios de células madre hematopoyéticas y precursores de células endoteliales y sanguíneas, a localizaciones específicas donde se agregan para formar vasos sanguíneos primitivos. Por otra parte, la neoformación de vasos sanguíneos puede producirse mediante la expansión de redes de vasos ya existentes o angiogénesis; para que esto ocurra, deben producirse una serie de procesos como expansión (*sprouting*), migración y proliferación de las células endoteliales, rotura (*pruning*) y anastomosis de los vasos. Además, la evidencia sugiere que los vasos sanguíneos se forman y se especializan para trabajar

en un órgano o tejido específico, controlados por señales locales de su microentorno (Sivaraj & Adams 2016).

El aporte sanguíneo del maxilar difiere cuando comparamos a un paciente edéntulo con uno dentado. En un maxilar con dientes, el riego sanguíneo procede del complejo de vasos y arteriolas suprapariosteas, arteriolas infraóseas y los capilares sanguíneos subepiteliales de la encía y el ligamento periodontal, perdiendo estos últimos cuando se pierde el diente (Liu & Kerns 2014).

En nuestro estudio se utilizó el anticuerpo CD34 para la detección de vasos sanguíneos mediante una técnica de inmunohistoquímica directa. Se encontraron vasos de varios tamaños y calibres. Las zonas del injerto donde más vasos se detectaron eran en aquellas con mayor cantidad de tejido conectivo, lo cual concuerda con estudios previos que describen que a mayor cantidad de tejido no mineralizado se ha relacionado con mayor cantidad de vasos sanguíneos (Galindo-Moreno y cols. 2014), lo cual se va a traducir en mayores porcentajes de hueso neoformado, ya que se describe una relación directa entre la cantidad de vasos sanguíneos en este tejido no mineralizado y su tasa de formación ósea (Yao y cols. 2004). Además, se ha observado mayor cantidad de vasos sanguíneos en las zonas del injerto más cercanas al hueso neoformado; esto concuerda con lo descrito por Degidi y colaboradores (Degidi y cols. 2006), quienes encuentran mayor densidad vascular en las zonas del injerto próximas al hueso neoformado que en las zonas del injerto próximas al hueso maduro diferenciado. Por otra parte, en el ensayo clínico de Deluiz y colaboradores (Deluiz y cols. 2015) que miden los vasos sanguíneos de aloinjertos frescos congelados córtico-esponjosos, se describe más cantidad de vasos a los 6 meses de cicatrización en comparación con 4 y 6 meses, lo que sugiere que la angiogénesis puede estar influenciada por otros factores además del tiempo. Por último, varios

estudios comparan el número de vasos en el hueso regenerado con el hueso prístino, encontrando mayor número en el regenerado, y la cantidad observada en nuestro estudio también es superior a la descrita por estos autores en el hueso nativo (Galindo-Moreno y cols. 2014; Degidi y cols. 2006; Boëck-Neto y cols. 2009).

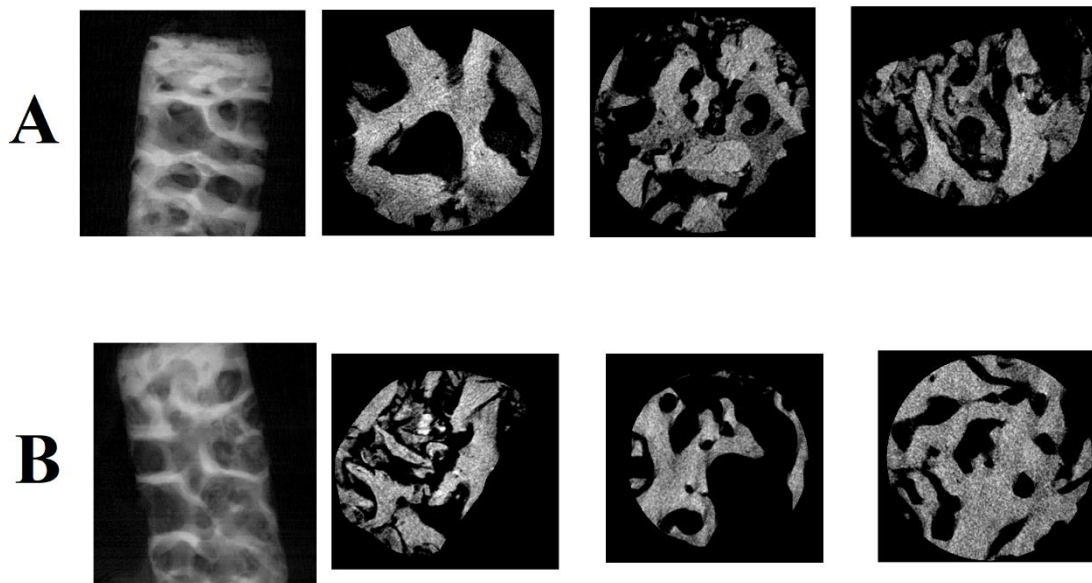
9. Micro TC

El micro TC resulta una prueba de gran utilidad para el análisis de las propiedades y arquitectura del tejido óseo, además presenta una ventaja respecto a la histología, que es la capacidad para analizar distintos parámetros de las trabéculas, como número, grosor y separación de las mismas, además de permitir analizar la densidad ósea o la densidad mineral del tejido. En ese marco, esta prueba también permite calcular el porcentaje del volumen óseo (BV/TV), con una fiabilidad comparable a la histomorfometría convencional (Müller y cols. 1998; Bernhardt y cols. 2012). En vista de su no destructividad, fiabilidad, poco de tiempo de análisis, bajo coste y capacidad de trabajar con volúmenes de alta definición, podría considerarse como la técnica de elección para la medición cuantitativa del tejido óseo y el estudio de su arquitectura.

Una de las limitaciones del micro TC es que no se pueden evaluar los tejidos blandos, o que, en ciertas ocasiones, como es nuestro caso, no permite discernir entre el hueso neoformado y el remanente del injerto; por ello, en nuestro estudio los valores del micro TC se han considerado como una variable secundaria, ya que los resultados obtenidos podrían corresponder a la arquitectura preexistente del bloque y no a la del hueso neoformado.

Pese a ello, la arquitectura y distribución trabecular observada en estos escáneres era casi indistinguible del hueso nativo del maxilar (Figura 3). Además, los resultados obtenidos son muy similares a los que describe el artículo de González-García y Monje (González-García & Monje 2012), que estudia 39 biopsias de hueso nativo maxilar, describiendo una media de BV/TV de $48.7 \pm 17.85\%$, grosor trabecular (T.Th) de 0.22 ± 0.6 mm, separación trabecular (T.S) de 0.31 ± 0.1 mm, y número de trabéculas (T.N) de $2.19 \pm 0.71/\text{mm}^3$. Resultados muy similares a los obtenidos en nuestro estudio, por lo que podemos concluir que la microarquitectura de estos bloques una vez incorporados es muy similar a la del hueso nativo del maxilar.

Figura 3



Micro CT de muestras de ambos grupos. A: grupo al que se le realizó la decorticación del lecho receptor. B: grupo control.

10. Supervivencia de los implantes

Los parámetros considerados para evaluar la supervivencia de los implantes en ambos estudios se basaron en el último World Workshop sobre la clasificación de las enfermedades periodontales y periimplantarias (Berglundh y cols. 2018). Se tuvieron en cuenta las variables profundidad de sondaje, sangrado al sondaje y pérdida ósea marginal, que se midieron en el baseline (a los tres meses de la colocación de la prótesis, cuando ya se ha establecido lo que se denomina “tejido blando supracrestal”, al año y a los dos años; cabe destacar, que la programación de las revisiones se individualiza para cada paciente, y está determinada por su riesgo periodontal, así en pacientes de alto riesgo se les revisó cada 4 meses durante los dos primeros años y fue únicamente en aquellos de muy bajo riesgo en los que se pautaron revisiones anuales; para hacer las comparaciones se utilizó un ANOVA de medidas repetidas, por lo que los tiempos de medición debían ser coincidentes, por ello se tomó de referencia el año y los dos años, ya que teníamos mediciones de todos los pacientes a esos tiempos. En todos los casos se colocaron los implantes a los 4 meses de la cirugía regenerativa.

En ambos estudios se utilizaron implantes de la casa Biomet 3i (Osseotite; Biomet 3i Inc., Palmbeach, FL). En el primer estudio se colocaron 93 implantes (39 en el grupo de bloques esponjosos y 54 en el de córtico-esponjosos), mientras que en el segundo estudio se colocaron 119 (53 en el grupo de la decorticación y 66 en el grupo control). En ninguno de los dos estudios se encontraron efectos adversos durante la cicatrización de los implantes, como las dehiscencias espontáneas o necrosis del injerto descritas por otros autores (Chiapasco y cols, 2015b ; Lumetti y cols, 2014b), y la tasa de supervivencia fue del 100% en ambos estudios a los dos años, ya que no se detectaron casos de periimplantitis; sí se detectaron varios casos de mucositis en

todos los grupos, que fueron tratados de forma efectiva mediante terapia no quirúrgica y solventados en menos de 20 días. Este tratamiento no quirúrgico consistió en un desbridamiento mecánico, con curetas de titanio y aeropulidores de eritritol, y una limpieza química, empleando clorhexidina, peróxido de hidrógeno, suero salino y metronidazol tópico irrigados a través del surco; además de instruir al paciente en técnicas de higiene específicas y pautar colutorios de clorhexidina al 0.12% durante 10 días (Rokaya y cols. 2020).

Los resultados observados en estos estudios respecto al comportamiento de los implantes en hueso regenerado con bloques alogénicos están en concordancia con los descritos en varias revisiones sistemáticas que se centran en este tipo de injertos. Monje y colaboradores (Monje y cols. 2014) describen una supervivencia media del 96.9% (IC 95%: 92.8–98.7%), teniendo en cuenta 228 implantes en un periodo medio de seguimiento de 23.9 meses. Waasdrop y colegas (Waasdrop y cols. 2010) describen una supervivencia del 99-100% en un periodo de 3 años. Una revisión sistemática reciente (Starch-Jensen y cols. 2020) que se centra en comparar estos aloinjertos en bloque con injertos autólogos, reporta una tasa del 90-100% en un periodo de seguimiento de 12-82 meses en bloques alogénicos, en estudios no comparativos; teniendo en cuenta los estudios comparativos se describe una tasa de supervivencia del 100% en ambas modalidades (bloques alogénicos y autólogos obtenidos de rama mandibular) a los 12 meses; respecto a la pérdida ósea marginal, este estudio describe una media de 1.2 mm en el momento de cargar el implante, 1.6 mm al año y 1.9 mm a los dos años, en los implantes colocados en hueso regenerado horizontalmente con aloinjertos en bloque, tasas muy similares a las descritas en nuestros estudios; por último, también describen que ningún implante colocado en

bloques alogénicos tuvo pérdida ósea por debajo de la primera espira en un periodo de seguimiento de 12-60 meses.

Las tasas de supervivencia descritas en la literatura en implantes colocados en estos bloques son muy parecidas a las de los implantes colocados en hueso prístino. Por todo ello, podemos sugerir que el comportamiento clínico de los implantes colocados en hueso regenerado con injertos en bloque alogénicos es muy similar al de los colocados en hueso nativo.

11. Uso de membranas

En el primero de nuestros estudios se utilizaron membranas de PRGF sobre los bloques, no por su efecto barrera, que puede ser limitado, sino para favorecer la cicatrización de los tejidos blandos y prevenir así la dehiscencia de la herida y exposición del bloque; además, tuvimos dos exposiciones parciales del injerto que se trataron de forma efectiva utilizando este mismo biomaterial.

En el segundo estudio se optó por no utilizar membranas colágenas sobre los bloques a fin de no interferir con la angiogénesis perióstica, y permitir que los vasos puedan penetrar y revascularizar la capa más superficial del bloque.

Respecto al uso de membranas en injertos en bloque tipo *onlay*, varios autores han propuesto que no son de utilidad, ya que, al ser un injerto de consistencia compacta, las células epiteliales no pueden penetrar en él, y puede comprometer la revascularización al no permitir el paso de vasos sanguíneos. Sin embargo, otros autores defienden que de esta forma se reduce la tasa de reabsorción del injerto.

Gielkens y colegas (Gielkens y cols. 2008), evaluaron este efecto sobre la reabsorción utilizando injertos en bloque autólogos en ratas y tres tipos de membranas (de poliláctico-poliglicólico, de colágeno y de politetrafluoroetileno expandido) contra el control que dejaron el bloque sin cubrir; se analizó la reabsorción con microrradiografías y micro TC a las 2, 4 y 12 semanas, sin encontrar diferencias estadísticamente significativas entre los 4 grupos. Estos resultados concuerdan con los de De Marco y colaboradores (De Marco y cols. 2005), de un diseño similar, también en ratas y con bloques autólogos, en los que comparan cubrir estos bloques con una membrana de politetrafluoroetileno expandido (PTFEe) o dejarlos sin cubrir; se centran en estudiar los vasos sanguíneos y el patrón de revascularización en ambos grupos, a los 3, 7, 14 y 21 días; concluyendo que en el grupo con membranas la angiogénesis solo se produjo desde el lecho receptor, mientras que en el grupo con membranas se produjo desde el lecho y desde el tejido conectivo circundante, detectando vasos sanguíneos en las capas externas del bloque desde el tercer día, y resultando en una revascularización completa a los 21 días en el grupo sin membrana barrera, mientras que en el otro se detectaron vasos sanguíneos en aproximadamente la mitad del bloque. Por el contrario, otros dos estudios con el mismo diseño, utilizando ratas y bloques autólogos, describen una menor reabsorción del bloque y una mayor neoformación ósea cuando se coloca una membrana de PTFEe sobre él, que cuando no se cubre (Jardini y cols. 2005; Nascimiento y cols. 2009).

Por el contrario, otros autores defienden que la membrana es algo más que una barrera inerte, y que tiene potencial bioactivo (Omar y cols. 2019), ya que pueden albergar células que secretan o expresan factores pro-osteogénicos. En este sentido, estudios en tibia de rata han demostrado una mayor expresión del factor de transcripción Cbfa1/Runx2, factor clave para la diferenciación osteoblástica, especialmente en la

región superior de los defectos; mayor expresión del ARNm de osteocalcina, proteína de la matriz extracelular y marcador de osteoblastos maduros; y mayor expresión del ARNm del VEGF a los 10 días, factor clave en la angiogénesis, en el grupo en el que usaron una membrana de PTFEe comparado con el control sin membrana (Tanaka y cols. 2007). Respecto a las membranas colágenas, se ha propuesto que su uso provoca un aumento de los genes responsables de la formación y remodelado óseo, como el receptor de la calcitonina, la catepsina K o el RANKL (Turri y cols. 2016).

En este mismo sentido, una revisión sistemática reciente (Zaki y cols. 2018) centrada en estudios en humanos, concluye que el uso de membranas sobre injertos en bloque autólogos conlleva una menor tasa de reabsorción de los mismos, sin aumentar el índice de complicaciones, y sin demostrar diferencias en términos de ganancia ósea y supervivencia del injerto; pese a remarcar que son necesarios más estudios controlados para confirmar este hallazgo.

La evidencia científica es muy limitada respecto a este tema si nos centramos en bloques alogénicos, por lo que se recomiendan más estudios para esclarecer el papel de una membrana barrera en todo tipo de injertos en bloque tipo *onlay*, y, especialmente, en aquellos de origen homólogo.

VIII. CONCLUSIONES

- El hábito tabáquico y una baja densidad ósea de la zona receptora implica una mayor reabsorción del injerto en bloque, tanto esponjoso como córtico-esponjoso.
- El 100% de los aloinjertos de estos dos ensayos se incorporaron con éxito desde un punto de vista clínico.
- El uso del bloque esponjoso conlleva una mayor tasa de reabsorción que el córtico-esponjoso.
- La decorticación del lecho receptor no mejora ni la neoformación ósea ni la angiogénesis de los injertos esponjosos en el maxilar.
- La microarquitectura y la disposición trabecular de los injertos esponjosos en el maxilar no se ve afectada por la realización de perforaciones en la zona receptora.
- La supervivencia de los implantes en ambos ensayos clínicos a los dos años fue del 100%.
- Los injertos en bloque alogénicos representan una opción terapéutica válida para la regeneración ósea horizontal y la ulterior supervivencia de los implantes.
- El osteocito es la célula ósea encargada de la mecanotransducción y, por tanto, es capaz de estimular tanto a osteoblastos como a osteoclastos, regulando el proceso de remodelado.
- Cuando el aloinjerto presenta osteocitos vivos en su interior, se comporta de manera muy similar al hueso prístino.

CONCLUSIONS

- Smoking and low bone density of the recipient site resulted in a higher resorption rate of both cancellous and cortico-cancellous block grafts.
- 100% of the allografts in these two trials were successfully incorporated clinically. As they were fixed to the recipient site, keeps immobile when removing the fixing screws and bled when the osteotomy was performed to place the implant.
- The use of the cancellous block leads to a higher resorption rate than the cortico-cancellous block.
- Decortication of the recipient bed does not improve neither bone neoformation nor angiogenesis of cancellous grafts in the maxilla.
- The microarchitecture and trabecular disposition of cancellous bone grafts is not affected by perforating the recipient site in maxilla.
- Implant survival in both clinical trials at two years was 100%.
- Allogeneic block grafts represent a valid therapeutic option for horizontal bone regeneration and subsequent implant survival.

IX. REFERENCES:

1. Acar, A.H., et al. (2016) "Is More Cortical Bone Decortication Effective on Guided Bone Augmentation?." *J Craniofac Surg*; 27: 1879-1883.
2. Acocella, A., et al (2012) "Maxillary alveolar ridge reconstruction with monocortical fresh-frozen bone blocks: a clinical, histological and histomorphometric study". *J Craniomaxillofac Surg*; 40: 525-533.
3. Adeyemo, W.L., et al. (2008) "Influence of host periosteum and recipient bed perforation on the healing of onlay mandibular bone graft: an experimental pilot study in the sheep". *Oral Maxillofac Surg*; 12: 19-28.
4. Albee, F.H. (1920) "Studies in bone growth: triple calcium phosphate as a stimulus to osteogenesis". *Ann Surg*;71(1):32-9.
5. Alvira-González, J., De Stavola, L. (2020) "The role of cortical perforations in bone regeneration: a systematic review". *Int J Oral Maxillofac Surg* ;49(7):945-951.
6. Amengual-Peñafiel, L., et al. (2019) "Coupling between Osseointegration and Mechanotransduction to Maintain Foreign Body Equilibrium in the Long-Term: A Comprehensive Overview". *J Clin Med*; 8(2):139.
7. Araújo, M.G., et al. (2015) "Alveolar socket healing: what can we learn?" *Periodontol 2000*; 68(1):122-134.
8. Araújo, M.G., Lindhe, J. (2005) "Dimensional ridge alterations following tooth extraction. An experimental study in the dog". *J Clin Periodontol*; 32(2):212-218.
9. Armulik, A., Genové, G., Betsholtz, C. (2011) "Pericytes: developmental, physiological, and pathological perspectives, problems, and promises". *Dev Cell*; 21: 193-215.
10. Badylak, S.F., Gilbert, T.W. (2008) "Immune response to biologic scaffold materials". *Semin Immunol*; 20(2):109-116.
11. Berglundh, T., et al. (2018) "Peri-implant diseases and conditions: consensus report of workgroup 4 of the 2017 world workshop on the classification of periodontal and Peri-implant diseases and conditions". *J Clin Periodontol*; 45: S286-S291.
12. Bernhardt, R., et al. (2012) "Comparison of bone-implant contact and bone-implant volume between 2D-histological sections and 3D-SR μ CT slices". *Eur Cell Mater*; 23:237-247.

13. Boden, S.D., Schimandle, J.H., Hutton, W.C. (1995) “An experimental lumbar intertransverse process spinal fusion model. Radiographic, histologic, and biomechanical healing characteristics”. *Spine (Phila Pa 1976)*; 20: 412-420.
14. Boëck-Neto, R.J., et al. (2009) “VEGF and MVD expression in sinus augmentation with autologous bone and several graft materials”. *Oral Dis*; 15:148-154.
15. Bolamperti, S., et al. (2018) “GH prevents adipogenic differentiation of mesenchymal stromal stem cells derived from human trabecular bone via canonical Wnt signaling”. *Bone*; 112:136-144.
16. Boskey, A.L. (2013) “Bone composition: relationship to bone fragility and antiosteoporotic drug effects”. *Bonekey Rep*; 2: 447.
17. Campos, J.M., et al. (2015) “Smoking modulates gene expression of type I collagen, bone sialoprotein, and osteocalcin in human alveolar bone”. *J Oral Maxillofac Surg*; 73(11):2123–2131
18. Canto, F.R., et al. (2008) “Influence of decortication of the recipient graft bed on graft integration and tissue neof ormation in the graft-recipient bed interface”. *Eur Spine J*; 17: 706-714.
19. Carano, R.A.D. & Filvaroff, E.H. (2003) “Angiogenesis and bone repair”. *Drug Discovery Today*; 8: 980–989.
20. 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(9):809-818.
21. Cawood, J.I., Howell, R.A. (1988) “A classification of the edentulous jaws”. *Int J Oral Maxillofac Surg*; 17: 232–236.
22. Cha, J.K., et al. (2011) “The influence of perforating the autogenous block bone and the recipient bed in dogs. Part II: histologic analysis”. *Clin Oral Implants Res*; 23: 987– 992.
23. Chan, G.K., Duque, G. (2002) “Age-related bone loss: old bone, new facts”. *Gerontology*; 48:62-71.
24. Chappuis, V., et al (2015) “Soft Tissue Alterations in Esthetic Postextraction Sites: A 3-Dimensional Analysis”. *J Dent Res*; 94(9):187S-193S.
25. Chappuis, V., et al. (2013) “Ridge alterations post-extraction in the esthetic zone: a 3D analysis with CBCT”. *J Dent Res*; 92(12):195S-201S.

26. Chiapasco, M., et al. (2015) "Clinical outcome of the use of fresh frozen allogeneic bone grafts for the reconstruction of severely resorbed alveolar ridges: preliminary results of a prospective study". *Int J Oral Maxillofac Implants*; 30: 450-460.
27. Chiapasco, M., et al. (2015) "Fresh frozen versus autogenous iliac bone for the rehabilitation of the extremely atrophic maxilla with onlay grafts and endosseous implants: preliminary results of a prospective comparative study". *Clin Implant Dent Relat Res*; 17:e251-e266.
28. Clavero, J., Lundgren, S. (2003) "Ramus or chin grafts for maxillary sinus inlay and local onlay augmentation: comparison of donor site morbidity and complications". *Clin Imp Dent Rel Res*; 5 (3):154–160.
29. Conti, O.J., Pastorello, M.T., Defino, H.L. (2006) "Bone decortication in spinal graft integration—an experimental study". *Acta Ortop Bras*; 14: 67–71.
30. Danesh-Sani, S.A., et al. (2017) "The influence of cortical bone perforation on guided bone regeneration in humans". *Int J Oral Maxillofac Surg*; 46: 261-266.
31. Dayangac, E., et al. (2016) "Radiological and Histological Evaluation of the Effects of Cortical Perforations on Bone Healing in Mandibular Onlay Graft Procedures". *Clin Implant Dent Relat Res*;18(1):82-8.
32. De Carvalho, P.S., Vasconcellos, L.W., Pi, J. (2000) "Influence of bed preparation on the incorporation of autogenous bone grafts: a study in dogs". *Int J Oral Maxillofac Implants*; 15 :565-570.
33. De Marco, A.C., Jardini, M.A., Lima, L.P. (2005) "Revascularization of autogenous block grafts with or without an e-PTFE membrane". *Int J Oral Maxillofac Implants*; 20(6):867-874.
34. Degidi, M., et al. (2006) "Microvessel density and vascular endothelial growth factor expression in sinus augmentation using bio-oss". *Oral Dis*; 12: 469–475.
35. Delloye, C., et al. (2002) "Perforations of cortical bone allografts improve their incorporation". *Clin Orthop Relat Res*; 396: 240-247.
36. Deluiz, D., et al. (2015) "Time-dependent changes in fresh-frozen bone block grafts: tomographic, histologic, and histomorphometric findings". *Clin Implant Dent Relat Res*; 17: 296-306.
37. Deluiz, D., et al. (2017) "Incorporation and Remodeling of Bone Block Allografts in the Maxillary Reconstruction: A Randomized Clinical Trial". *Clin Implant Dent Relat Res*; 19:180-194.

38. Devlin, H., Horner, K., Ledgerton, D. (1998) "A comparison of maxillary and mandibular bone mineral densities". *Journal of Prosthetic Dentistry*; 79: 323–327.
39. Donovan, M.G., et al. (1993) "Autologous calvarial and iliac onlay bone grafts in miniature swine". *J Oral Maxillofac Surg*; 51:898-903.
40. Eppley, B.L., Pietrzak, W.S., Blanton, M.W. (2005) "Allograft and alloplastic bone substitutes: a review of science and technology for the craniomaxillofacial surgeon". *J Craniofac Surg*; 16(6):981-989.
41. Esposito, M., et al. (1998) "Biological factors contributing to failures of osseointegrated oral implants. (I). Success criteria and epidemiology". *Eur J Oral Sci*; 106:527-552.
42. Föger-Samwald, U., et al. (2014) "Molecular evidence of osteoblast dysfunction in elderly men with osteoporotic hip fractures". *Exp Gerontol*; 57:114-151.
43. Föger-Samwald, U., et al. (2016) "Molecular mechanisms of osteoporotic hip fractures in elderly women". *Exp Gerontol*; 73:49-58.
44. Frost, H.M. (1983) "The Regional Acceleratory Phenomenon: A Review". *Henry Ford Hosp Med J*; 31: 3-9.
45. Fu, J.H., Wang, H.L. (2011) "Horizontal bone augmentation: the decision tree". *Int J Periodontics Restorative Dent*; 31: 429-436.
46. Galindo-Moreno, P., et al. (2010) "Optimal microvessel density from composite graft of autogenous maxillary cortical bone and anorganic bovine bone in sinus augmentation: influence of clinical variables". *Clin Oral Implants Res*; 21: 221-227.
47. Giannoudis, P.V., Dinopoulos, H., Tsiridis, E. (2005) "Bone substitutes: An update". *Injury*; 36 (3): S20-S27.
48. Gielkens, P.F.M., et al. (2008) "The Influence of Barrier Membranes on Autologous Bone Grafts". *J Dent Res*; 87(11):1048-1052.
49. González-García, R., Monje, F. (2012) "Is micro-computed tomography reliable to determine the microstructure of the maxillary alveolar bone?". *Clin Oral Implants Res*; 00:1-8
50. Gordh, M., et al. (1997) "Bone graft incorporation after cortical perforations of the host bed". *Otolaryngol Head Neck Surg*; 117: 664-670.

51. Greenstein, G., et al. (2009) "The Role of Bone Decortication in Enhancing the Results of Guided Bone Regeneration: A Literature Review". *J Periodontol*; 80: 175-89.
52. Guillaume, B., et al. (2009) "Viability of osteocytes in bone autografts harvested for dental implantology". *Biomed Mater*; 4(1):015012.
53. Hämmerle, C.H., Jung, R.E. (2003) "Bone augmentation by means of barrier membranes". *Periodontol 2000*; 33: 36-53.
54. Hämmerle, C.H.F., Tarnow, D. (2018) "The etiology of hard- and soft-tissue deficiencies at dental implants: A narrative review". *J Periodontol*; 89 Suppl 1: S291-S303.
55. Hans, D., Fuerst, T., Uffmann, M. (1996) "Bone density and quality measurement using ultrasound". *Curr Opin Rheumatol*; 8(4):370-375.
56. Jaffin, R.A., Berman, C.L. (1991) "The excessive loss of Branemark fixtures in type IV bone: a 5-year analysis". *J Periodontol*; 62:2-4.
57. Jager, A., et al. (1990) "Quantitative determination of alveolar bone density using digital image analysis of microradiographs". *Anatomischer Anzeiger*; 170: 171–179.
58. Jardini, M.A., De Marco, A.C., Lima, L.A. (2005) "Early healing pattern of autogenous bone grafts with and without e-PTFE membranes: a histomorphometric study in rats". *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*; 100(6): 666-673.
59. Jemt, T., et al. (1992) "Failures and complications in 92 consecutively inserted overdentures supported by Brånemark implants in severely resorbed edentulous maxillae: A study from prosthetic treatment to first annual check-up". *Int J Oral Maxillofac Implants*; 7: 162–167.
60. Jensen, S.S., Terheyden, H. (2009) "Bone augmentation procedures in localized defects in the alveolar ridge: clinical results with different bone grafts and bone-substitute materials". *Int J Oral Maxillofac Implants*; 24: 218-236.
61. Jun, C.M., Yun, J.H. (2016) "Three-Dimensional Bone Regeneration of Alveolar Ridge Defects Using Corticocancellous Allogeneic Block Grafts: Histologic and Immunohistochemical Analysis". *Int J Periodontics Restorative Dent*; 36:75-81.
62. Jung, R.E., et al. (2012) "Systematic review of the survival rate and the incidence of biological, technical, and aesthetic complications of single crowns on implants reported in longitudinal studies with a mean follow-up of 5 years". *Clin Oral Implants Res*; 23(6): 2-21.

63. Kasper, G., et al. (2009) “Insights into mesenchymal stem cell aging: involvement of antioxidant defense and Actin cytoskeleton”. *Stem Cells*; 27:1288-1297.
64. Khan, S.N., et al. (2005) “The biology of bone grafting”. *J Am Acad Orthop Surg*; 13(1):77-86.
65. Lafzi, A., et al. (2016) “In vitro effect of mineralized and demineralized bone allografts on proliferation and differentiation of MG-63 osteoblast-like cells”. *Cell Tissue Bank*; 17:91-104.
66. Lee, S.H., Lim, P., Yoon, H.J. (2014) “The influence of cortical perforation on guided bone regeneration using synthetic bone substitutes: a study of rabbit cranial defects”. *Int J Oral Maxillofac Implants*; 29: 464-471.
67. Lekholm, U., Zarb, G.A., Albrektsson, T, (1985): “Patient selection and preparation. Tissue integrated prostheses.” *Chicago: Quintessence Publishing Co. Inc.* 199-209.
68. Levin, L., Kessler-Baruch, O. (2013) “Cigarette smoking and the alveolar bone around teeth and dental implants”. *N Y State Dent J*; 79: 53-59.
69. Li, H., et al. (2000) “Identification of bone morphogenetic proteins 2 and 4 in commercial demineralized freeze-dried bone allograft preparations: pilot study”. *Clin Implant Dent Relat Res*; 2: 110-117.
70. Lindhe, J., et al. (2012) “The alveolar process of the edentulous maxilla in periodontitis and non-periodontitis subjects”. *Clin Oral Impl Res*; 23: 5–11.
71. Liu, J., Kerns, D.G. (2014) “Mechanisms of Guided Bone Regeneration: A Review”. *Open Dent J*; 16: 56-65.
72. Lumetti, S., et al. (2014) “Correlation between density and resorption of fresh-frozen and autogenous bone grafts”. *Biomed Res Int*; 2014:1-6.
73. Lumetti, S., et al. (2014) “Fresh-frozen bone blocks for horizontal ridge augmentation in the upper maxilla: 6-month outcomes of a randomized controlled trial,” *Clin Imp Dent Rel Res*; 16 (1): 116– 123.
74. Lundgren, A.K., et al. (2000) “Influence of decortication of the donor bone on guided bone augmentation. An experimental study in the rabbit skull bone”. *Clin Oral Implants Res*; 11(2):99-106.
75. Majzoub, Z., et al. (1999) “Role of intramarrow penetration in osseous repair: a pilot study in the rabbit calvaria”. *J Periodontol*; 70:1501-1510.

76. Manolagas, S.C. (2000) "Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis". *Endocr Rev*; 21(2):115-37.
77. Mansour, A., et al. (2017) "Extracellular matrices for bone regeneration: a literature review". *Tissue Eng Part A*; 23: 1436-1451.
78. Mansour, A., et al. (2019) "Bone extracts immunomodulate and enhance the regenerative performance of dicalcium phosphates bioceramics". *Acta Biomater*; 89:343-358.
79. Marenzana, M., Arnett, T.R. (2013) "The Key Role of the Blood Supply to Bone". *Bone Res*; 3: 203-215.
80. Min, S., et al. (2007) "Effects of marrow penetration on bone augmentation within a titanium cap in rabbit calvarium". *J Periodontol*; 78:1978-1984.
81. Monje, A., et al. (2014) "On the feasibility of utilizing allogeneic bone blocks for atrophic maxillary augmentation". *Biomed Res Int*; 2014:814578.
82. Monje, A., Wang, H.L. (2017) "Biological and physical properties of bone block grafting biomaterials for alveolar ridge augmentation". *Int J Oral Sci*; 183: 18-30.
83. Moraschini, V., et al. (2015) "Evaluation of survival and success rates of dental implants reported in longitudinal studies with a follow-up period of at least 10 years: a systematic review". *Int J Oral Maxillofac Surg*; 44(3):377-388.
84. Müller, R., et al. (1998) "Morphometric analysis of human bone biopsies: a quantitative structural comparison of histological sections and microcomputed tomography". *Bone*; 23:59-66.
85. Nascimento, R.D., et al. (2009) "Influence of osteopenia in autogenous bone graft healing with or without expanded polytetrafluoroethylene membranes: histologic and histomorphometric study in rats". *Int J Oral Maxillofac Implants*. 24(6): 1074-1082.
86. Nissan, J., et al. (2011) "Cancellous bone block allografts for the augmentation of the anterior atrophic maxilla," *Clin Imp Dent Rel Res*; 13 (2):104–111.
87. Nissan, J., et al. (2011) "Histomorphometric analysis following augmentation of the posterior mandible using cancellous bone-block allograft". *J Biomed Mater Res A*; 97:509-513.
88. Nissan, J., et al. (2012) "Histomorphometric analysis following augmentation of the anterior atrophic maxilla with cancellous bone block allograft". *Int J Oral Maxillofac Implants*; 27: 84-89.

89. Nissan, J., et al. (2012) "Histomorphometric analysis following augmentation of the anterior atrophic maxilla with cancellous bone block allograft". *Int J Oral Maxillofac Implants*; 27:84-89.
90. Nkenke, E., et al. (2001) "Morbidity of harvesting of chin grafts: a prospective study". *Clin Oral Impl Res*; 12(5):495–502.
91. Norton, M.R., Gamble, C. (2001) "Bone classification: an objective scale of bone density using the computerized tomography scan". *Clin Oral Impl Res*; 12:79–84.
92. Oh, K.C., et al. (2011) "The influence of perforating the autogenous block bone and the recipient bed in dogs. Part I: a radiographic analysis". *Clin Oral Implants Res*; 22: 1298-1302.
93. Omar, O., et al. (2019) "Barrier membranes: More than the barrier effect?". *J Clin Periodontol*; 46(21):103-123.
94. Oppenheimer, A.J., Tong, L., Buchman, S.R. (2008) "Craniofacial bone grafting: Wolff's law revisited". *Craniofacial Trauma Reconstr*; 1(1):49-61.
95. Ozaki, W., Buchman, S.R. (1998) "Volume maintenance of onlay bone grafts in the craniofacial skeleton: micro-architecture versus embryologic origin". *Plast Reconstr Surg*; 102:291-299.
96. Ozaki, W., et al. (1999) "A comparative analysis of the microarchitecture of cortical membranous and cortical endochondral onlay bone grafts in the craniofacial skeleton". *Plast Reconstr Surg*; 104:139-147.
97. Ozkan A, Bayar GR, Altug HA, Sencimen M, Dogan N, Gunaydin Y, Ergodan E. The effect of cigarette smoking on the healing of extraction sockets: an immunohistochemical study. *J Craniofac Surg*. 2014;25(4):e397-402.
98. Pauwels R, Jacobs R, Singer SR, Mupparapu M. CBCT-based bone quality assessment: are Hounsfield units applicable? *Dentomaxillofac Radiol*. 2015;44(1):20140238.
99. Pedrosa, W.F. Jr, et al. (2009) "Immunohistochemical, tomographic and histological study on onlay bone graft remodeling. Part II: calvarial bone". *Clin Oral Implants Res*; 20:1254-1264.
100. Peterson, J., Wang, Q., Dechow, P.C. (2006) "Material properties of the dentate maxilla". *The Anatomical Record*; 288 (9): 962-972.
101. Rokaya, D., et al. (2020) "Peri-implantitis Update: Risk Indicators, Diagnosis, and Treatment". *Eur J Dent*; 14(4):672-682.

102. Sanz-Sánchez, I., et al. (2015) “Effectiveness of Lateral Bone Augmentation on the Alveolar Crest Dimension: A Systematic Review and Meta-analysis”. *J Dent Res*; 94(9): 128S-142S.
103. Schropp, L., et al. (2003) “Bone healing and soft tissue contour changes following single-tooth extraction: a clinical and radiographic 12-month prospective study”. *Int J Periodontics Restorative Dent*; 23: 313–323.
104. Schwarz, M.S., et al. (1987) “Computed tomography: Part II. Preoperative assessment of the maxilla for endosseous implant surgery”. *Int J Oral Maxillofac Implants*; 2: 143–148.
105. Schwarz, M.S., et al. (1989) “Computed tomography in dental implantation surgery”. *Dent Clin North Am*; 33(4):555-597.
106. Shah, F.A., et al. (2019) “Does Smoking Impair Bone Regeneration in the Dental Alveolar Socket?” *Calcif Tissue Int*; 105(6):619-629.
107. Sheikh, Z., et al. (2015) Macrophages, Foreign Body Giant Cells and Their Response to Implantable Biomaterials. *Materials (Basel)*; 8(9):5671-5701.
108. Sivaraj, K.K., Adams, R.H. (2016) “Blood vessel formation and function in bone”. *Development*; 143: 2706-2715.
109. Slotte, C., Lundgren, D. (2002) “Impact of cortical perforations of contiguous donor bone in a guided bone augmentation procedure: an experimental study in the rabbit skull”. *Clin Implant Dent Relat Res*; 4(1):1-10.
110. Spin-Neto, R., et al. (2013) “Immunological aspects of fresh-frozen allogeneic bone grafting for lateral ridge augmentation”. *Clin Oral Implants Res*; 24(9):963-968.
111. Spin-Neto, R., et al. (2014) “Graft incorporation and implant osseointegration following the use of autologous and fresh-frozen allogeneic block bone grafts for lateral ridge augmentation”. *Clin Oral Implants Res*; 25:226-233.
112. Starch-Jensen, T., Deluiz, D., Tinoco, E.M.B. (2020) “Horizontal alveolar ridge augmentation with allogeneic bone block graft compared with autogenous bone block graft: a systematic review”. *J Oral Maxillofac Res*; 11: e1.
113. Stevenson, S. (1999) “Biology of bone grafts”. *Orthop Clin North Am*; 30 (4): 543-552.
114. Tan, W.L., et al. (2012) “A systematic review of post-extractional alveolar hard and soft tissue dimensional changes in humans”. *Clin Oral Implants Res*; 23 (5): 1-21.

115. Tanaka, S., et al. (2007) "Characteristics of newly formed bone during guided bone regeneration: Analysis of cbfa-1, osteocalcin, and VEGF expression". *J Oral Implantol*; 33: 321–326.
116. Thomsen, J.S., Ebbesen, E.N., Mosekilde, L. (1998) "Relationships between static histomorphometry and bone strength measurements in human iliac crest bone biopsies". *Bone*; 22: 153–163.
117. Trombelli, L., et al. (2008) "Modeling and remodeling of human extraction sockets". *J Clin Periodontol*; 35(7):630-639.
118. Turri, A., et al. (2016) "Guided bone regeneration is promoted by the molecular events in the membrane compartment". *Biomaterials*; 84: 167–183.
119. Waasdorp, J., Reynolds, M. (2010) "Allogeneic bone onlay grafts for alveolar ridge augmentation: a systematic review". *Int J Oral Maxillofac Implants*; 25: 831-833.
120. Wang, H.L., Boyapati, L. (2006) "'PASS" principles for predictable bone regeneration". *Implant Dent*; 15(1):8-17.
121. Wang, J., et al. (2017) "M2 macrophages contribute to osteogenesis and angiogenesis on nanotubular TiO₂ surfaces". *J Mater Chem B*; 5(18):3364-3376.
122. Whitaker, L.A. (1989) "Biological boundaries: a concept in facial skeletal restructuring". *Clin Plast Surg*; 16:1-10.
123. Widmark, G., Andersson, B., Ivanoff, C.J. (1997) "Mandibular bone graft in the anterior maxilla for single-tooth implants: presentation of a surgical method," *Int J Oral and Maxillofac Surg*; 26(2): 106–109.
124. Winet, H. (1996) "The role of microvasculature in normal and perturbed bone healing as revealed by intravital microscopy". *Bone*; 19: 39S-57S.
125. Xiong, J., et al (2014). Osteocyte-derived RANKL is a critical mediator of the increased bone resorption caused by dietary calcium deficiency. *Bone*; 66: 146–154.
126. Yao, Z., et al. (2004) "Increase of both angiogenesis and bone mass in response to exercise depends on VEGF". *J Bone Miner Res*; 19: 1471-1480.
127. Zaki, J., et al. (2018) "The effect of membrane coverage on the resorption of autogenous intraoral block grafts in horizontal ridge augmentation: a systematic review of literature and meta-analysis: inevitability or an iatrogenic vulnerability?" *J Evid Based Dent Pract*; 18:275-289.

128. Zara, J.N., et al. (2011) "High doses of bone morphogenetic protein 2 induce structurally abnormal bone and inflammation in vivo". *Tissue Eng Part A*; 17: 1389-1399.
129. Zerbo, I.R., et al. (2003) "Fate of monocortical bone blocks grafted in the human maxilla: a histological and histomorphometric study". *Clin Oral Implants Res*; 14(6): 759-766.
130. Zhao, X., et al. (2018) "The effect of smoking behavior on alveolar bone marrow Mesenchymal stem cells of clinical implant patient". *Biomed Res Int*; 2018:7672611-7672695.
131. Zhou, S., et al. (2008) "Age-related intrinsic changes in human bone-marrow-derived mesenchymal stem cells and their differentiation to osteoblasts". *Aging Cell*; 7(3):335-343.