

UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA



INVESTIGACIÓN EN ESTOMATOLOGÍA

TESIS DOCTORAL

"EVALUACION DEL COMPORTAMIENTO DE UN INJERTO
INTRASINUSAL COMPUESTO"

ILDEFONSO MORENO RIESTRA

DIRECTORES

PROF. DR. PABLO ANTONIO GALINDO MORENO

PROF. DR. FRANCISCO JAVIER O'VALLE RAVASSA

DR. MIGUEL PADIAL MOLINA

GRANADA – 2015

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Ildelfonso Moreno Riestra
ISBN: 978-84-9125-633-5
URI: <http://hdl.handle.net/10481/43248>

UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA



El trabajo de investigación que se expone en la presente Tesis Doctoral, titulada “Evaluación del comportamiento de un injerto intrasinusal compuesto”, ha sido realizado bajo nuestra dirección por Don Ildelfonso Moreno Riestra.

Una vez publicados los artículos correspondientes en las revistas del área, se considera oportuno, y así lo aprueban los codirectores de la Tesis, su presentación como compendio de publicaciones, tanto por la relevancia de las mismas como por el esfuerzo ya realizado por el doctorando para su publicación y la calidad alcanzada en forma de citas recibidas.

La presente memoria ha sido revisada y es adecuada para ser presentada y permitir al doctorando aspirar al Título de Doctor ante el Tribunal que en su día se designe.

El doctorando y los directores de la tesis garantizamos, al firmar esta Tesis Doctoral, que el trabajo ha sido realizado por el doctorando bajo la dirección de los directores de la tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Y para que conste, en cumplimiento de las disposiciones vigentes, se expide la presente en Granada a 5 de noviembre de 2015,

Ildelfonso Moreno Riestra

Doctorando

Pablo Antonio Galindo Moreno

Profesor Titular
Dpto. de Estomatología
Facultad de Odontología
Universidad de Granada

Francisco Javier O’Valle Ravassa

Profesor Titular
Dpto. de Anatomía Patológica e
Historia de la Ciencia
Facultad de Medicina
Universidad de Granada

Miguel Padiál Molina

Investigador Contratado
Dpto. de Estomatología
Facultad de Odontología
Universidad de Granada

AGRADECIMIENTOS

A mis padres: Ildefonso y Dolores, que me dieron la vida y me brindaron la oportunidad de estudiar una carrera. Ejemplo inestimable de lucha, ética, seriedad, ilusión y constancia.

A mis hermanos: Javier y María, por su cariño, soporte y admiración continua.

A mis abuelos: Vicenta, Antonio, Micaela y Diego. Allá donde estéis, estoy seguro de que os estaréis alegrando. Por vuestro amor y por hacerme sentir siempre orgulloso de ser vuestro nieto.

A mi esposa, Livia, ejemplo de sacrificio en el estudio y trabajadora incansable. Por su cariño y amor, sobre todo en los momentos mas difíciles.

A mi hijo, Ildefonso, cuya sonrisa me llena de fuerza todos los días para seguir luchando.

Al Profesor Pablo Galindo Moreno, mi maestro, mi mentor, mi compañero, mi amigo. Contigo empezó todo. No caben ni agradecimientos ni ensalzamientos posibles para poder demostrar cuan importante has sido y eres para mi en todos los niveles. Son muchas las batallas libradas y mucha la experiencia obtenida de ellas gracias a ti.

Al Dr. Miguel Padial Molina, gran amigo y co-director de esta tesis. Mas allá de la inestimable ayuda que me has brindado, tu nobleza y humildad como persona es una lección de vida para mi.

Al Profesor Francisco O'Valle Ravassa, co-director de esta tesis le agradezco su magnífica labor al frente de las técnicas inmunohistoquímicas, a la par de su ilusión porque este proyecto saliera adelante.

A la Profesora Elena Sánchez Fernández, cuya pasión y profesionalidad hicieron que me interesase por la Cirugía en los primeros momentos.

Al Profesor Gustavo Ávila Ortiz, con quien he compartido y aprendido tanto. Tu capacidad de trabajo y de lucha son un ejemplo para mi.

Al Profesor Hom Lay Wang, quien me brindó dar un gran salto en mi formación en el departamento de Periodoncia de la Universidad de Míchigan.

Al Dr. Serafín Maza Lozano, escudero leal, trabajador incansable y gran amigo. Gracias por todos tus esfuerzos diarios, ilusión y tiempo que me ayudan a seguir adelante.

A mi equipo de auxiliares e higienistas, cuya labor diaria me ayuda a avanzar y a seguir desarrollándome. Por su gran ejemplo de trabajo y tesón.

A mis amigos y colegas de profesión, Antonio, Andrés, Jesús, Carlos, Jesús Alonso, Hugo, Juan, Alfonso, etc... Que tanto me ayudan y de los que tanto aprendo. Por vuestra sincera amistad y soporte.

A mis amigos personales, Curro, Rosi, Jesús, Chari, Miguel, María, Francisco, Abel, Cristóbal, Jorge, Eva, Luis, Antonio, etc... por su cariño y porque siempre están ahí, tanto en los buenos como en los malos momentos.

A la Facultad de Odontología y la Universidad de Granada.

ÍNDICE

ÍNDICE

TESIS COMO COMPENDIO DE TRABAJOS PUBLICADOS	5
RESUMEN	9
INTRODUCCIÓN GENERAL	13
Fisiología Normal del Tejido Óseo	15
Biodinámica del Tejido Óseo	30
Pérdida Dentaria – Pérdida Ósea	34
Técnicas de Elevación de Seno	36
OBJETIVOS	55
APORTACIONES DEL DOCTORANDO	59
METODOLOGÍA	63
RESULTADOS PRINCIPALES	73
DISCUSIÓN	79
CONCLUSIONES	87
BIBLIOGRAFÍA	91
ANEXOS	111
Indicios de Calidad de las Publicaciones	113
Copia de los Trabajos Publicados	115

***TESIS COMO
COMPENDIO***

TESIS COMO COMPENDIO DE TRABAJOS PUBLICADOS

La presente Tesis Doctoral, de acuerdo con el informe correspondiente, autorizado por los Directores de Tesis y el órgano responsable del Programa de Doctorado, se presenta como un compendio de trabajos previamente publicados. Las referencias completas de los artículos que constituyen el cuerpo de la tesis y que se adjuntan como anexos son los siguientes:

1. Galindo-Moreno P, **Moreno-Riestra I**, Ávila G, Fernández-Barbero JE, Mesa F, Aguilar M, Wang H-L, O'Valle F. Histomorphometric comparison of maxillary pristine bone and composite bone graft biopsies obtained after sinus augmentation. *Clinical Oral Implants Research*, 2010;21(1):122-128.
2. Galindo-Moreno P, **Moreno-Riestra I**, Avila G, Padial-Molina M, Paya JA, Wang H-L, O'Valle F. Effect of anorganic bovine bone to autogenous cortical bone ratio upon bone remodeling patterns following maxillary sinus augmentation. *Clinical Oral Implants Research*, 2011;22(8):857-864.
3. Galindo-Moreno P, **Moreno-Riestra I**, Ávila-Ortiz G, Padial-Molina M, Gallas-Torreira M, Sánchez-Fernández E, Mesa F, Wang HL, O'Valle F. Predictive factors for maxillary sinus augmentation outcomes: a case series analysis. *Implant Dentistry*, 2012;21(5):433-440.

Además, fruto de las actividades desarrolladas durante la realización de éstos trabajos, se han presentado las siguientes comunicaciones y pósters:

COMUNICACIONES Y PÓSTERES EN CONGRESOS NACIONALES

1. **Moreno Riestra I**, Galindo Moreno P, O'Valle Ravassa F, Fernández Jiménez A, López Martínez J, Sánchez Fernández E. Evaluación de comportamiento del tejido conectivo en material injertado en el seno maxilar. V Congreso Nacional de la Sociedad Española de Cirugía Bucal, 2007.
2. Fernández Jiménez A, Galindo Moreno P, Ferre López C, **Moreno Riestra I**, Batista Cruzado A, Sanchez Fernández E. Descripción de una técnica modificada para la elevación de seno maxilar. V Congreso Nacional de la Sociedad Española de Cirugía Bucal, 2007.

3. Hernández Arredondo, M; Sánchez Fernández E; Avila G; **Moreno Riestra I**; O'Valle F; Galindo Moreno P. Colonización celular y neovascularización del hueso bovino anorgánico empleado para elevación de seno maxilar. VII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Cirugía Bucal, 2009.
4. O'Valle F, Mesa F, Marfil Alvarez R, **Moreno Riestra I**, Aneiros Fernández J, Galindo Moreno P. Persistencia del biomaterial (Bio-Oss®) en la elevación de seno maxilar. Histopatología y morfometría de un estudio cronológico. 1er Congreso Nacional de la Sociedad Científica de Odontología Implantológica, 2011.

COMUNICACIONES Y PÓSTERES EN CONGRESOS INTERNACIONALES

1. Galindo Moreno P, Avila G, Rios H, Ferre Lopez C, **Moreno Riestra I**, Fernández Jimenez A, Wang HL. Comparative study using two different composite bone graft mixtures for sinus augmentation. The 9th International Symposium on Periodontics & Restorative Dentistry, 2007.
2. Avila Ortiz G, Galindo-Moreno P, **Moreno Riestra I** López-Martínez J, Fernández Jiménez A, Rios H, Sánchez-Fernández E, Wang HL. Evaluation of sinus augmentation using a composite bone graft mixture. 16th European Association of Osseointegration Annual Scientific Meeting, 2007.
3. Galindo-Moreno P, Avila G, **Moreno Riestra I**, Ferre-López C, López-Martínez J, Fernández-Barbero J, Mesa-Aguado F, O'Valle-Ravassa F. Immunocytochemical evaluation of differentiation markers after sinus grafting. 16th European Association of Osseointegration Annual Scientific Meeting, 2007.
4. Galindo-Moreno P, Avila G, **Moreno Riestra I**, Rios H, Rudek I, Wang H-L & O'Valle-Ravassa F. Analysis of cell differentiation and bone remodelling patterns after sinus grafting. 17th European Association of Osseointegration Annual Scientific Meeting, 2008.

RESUMEN

RESUMEN

Introducción: Los procedimientos de elevación de suelo de seno maxilar tienen por objeto la generación de hueso nuevo en el maxilar posterior para permitir la posterior colocación de implantes dentales que soportarán rehabilitaciones protésicas. Se han propuesto numerosas modificaciones a la técnica descrita originalmente, incluyendo una amplia variedad de materiales de injerto. Sin embargo, la calidad del tejido óseo neoformado no ha sido claramente diferenciada ni se han analizado las variables que influyen en el proceso de consolidación del injerto.

Por tanto, los objetivos del presente trabajo fueron: **Objetivo 1)** Analizar morfológica e histomorfológicamente las diferencias entre hueso nativo posterior maxilar y el obtenido 6 meses tras la realización de técnicas de elevación de suelo de seno maxilar empleando un injerto compuesto de hueso bovino anorgánico y hueso autólogo obtenido mediante rascador; **Objetivo 2)** Comparar los resultados histológicos obtenidos con el uso de dos combinaciones de injerto con diferentes proporciones de hueso bovino anorgánico y hueso autólogo; **Objetivo 3)** Evaluar la influencia de un grupo de variables dependientes del paciente en los resultados histológicos, histomorfométricos y radiológicos tras la elevación del suelo del seno maxilar.

Material y métodos: Se diseñó un estudio clínico multicéntrico en el que se incluyeron pacientes con necesidad de elevación de suelo de seno en 2 fases para permitir la obtención de muestras del tejido óseo neoformado 6 meses tras la colocación del injerto durante la colocación del implante dental. El injerto consistió en una mezcla 50%-50% o 20%-80% de hueso autógeno obtenido mediante rascador y hueso bovino anorgánico. Se analizaron variables radiográficas (altura de cresta remanente previa a la elevación de seno y altura obtenida tras el injerto) y clínicas del paciente (edad, sexo, tipo de edentulismo, consumo de alcohol y tabaco e historia de enfermedad periodontal).

Resultados: Se observó una mayor actividad remodeladora en sitios injertados en comparación con sitios de hueso nativo, con un mayor número de líneas osteoides en senos injertados. Dichas líneas se observaron ultraestructuralmente en íntimo contacto con las partículas remanentes de hueso bovino anorgánico. La proporción de hueso autógeno y bovino

-

anorgánico empleada no influyó en la proporción de tejido mineralizado y no mineralizado a los 6 meses, si bien sí se observó un mayor número de líneas osteoides y mayor celularidad en el grupo 50-50. La mayor proporción de partículas de hueso bovino anorgánico remanentes se correlacionó con una menor pérdida ósea vertical medida en radiografía. Además, los pacientes edéntulos y con historia de periodontitis presentaron también diferencias significativas en los patrones de reabsorción ósea. Del mismo modo, el consumo de tabaco y alcohol influyó de forma negativa en la formación de nuevo hueso tras el injerto. No obstante, ninguna de las variables dependientes del paciente influyó en la tasa de supervivencia de los implantes y las prótesis tras 2 años de carga funcional.

Conclusiones: La combinación de hueso autógeno y hueso bovino anorgánico proporciona resultados histológicos satisfactorios en combinación con resultados clínicos excelentes. El uso de injertos con proporciones similares de ambos tipos de hueso proporciona los mejores resultados histológicos. El tipo de edentulismo, la historia de periodontitis y el consumo de alcohol y tabaco influyen en la remodelación del injerto, medida tanto a nivel histológico como en su reabsorción vertical.

INTRODUCCIÓN
GENERAL

INTRODUCCIÓN GENERAL

FISIOLOGÍA NORMAL DEL TEJIDO ÓSEO

El tratamiento con biomateriales para la regeneración ósea requiere de un conocimiento previo profundo y preciso del metabolismo y fisiología normal del tejido óseo. Así, las bases biológicas que se describirán a continuación y que han sido tratadas con mayor amplitud con anterioridad (Padial Molina, 2010), deben ser tenidas muy en cuenta al tratar cualquier aspecto relativo a la regeneración del tejido óseo.

El tejido óseo es el tejido conectivo especializado constituyente principal de los huesos en los vertebrados. Se compone, entre otros, de componentes extracelulares calcificados y no calcificados y células. En general, se caracteriza por su gran resistencia a la tracción y a la compresión gracias a su cierta elasticidad a la vez que por su rigidez. La musculatura usa el tejido óseo como sitio de inserción y sostén del peso para ejercer su acción mecánica. Además, da rigidez al organismo, contiene la médula ósea hematopoyética y protege órganos vitales. El hueso también sirve como reservorio de calcio (el 99% del Ca^{2+} del organismo) y otros iones como el fósforo. Sus componentes principales son las células (osteoprogenitoras, osteoblastos, osteocitos y osteoclastos) y la matriz extracelular (fase orgánica e inorgánica) (Padial Molina, 2010).

1. 1. Componentes celulares

En el tejido óseo podemos distinguir cuatro tipos celulares principales: células osteoprogenitoras, osteoblastos, osteocitos y osteoclastos (Applegate, 1995; Van de Graaff, 1998) (Tabla 1).

Tabla 1: Resumen de las funciones de las principales células del tejido óseo (adaptado de (Padial Molina, 2010))

TIPO CELULAR	FUNCIÓN
Células osteoprogenitoras	Reservorio de células precursoras
Osteoblasto	Reorganización interna del hueso Crecimiento óseo Curación de fracturas Síntesis de la matriz y depósito de sales
Osteoclasto	Reabsorción no mineral Reabsorción mineral
Osteocito	Mantenimiento de la matriz Reabsorción mediante osteolisis osteocítica

1. 1. 1. Células osteoprogenitoras

Como en todos los tejidos conectivos, las células progenitoras son células de origen mesenquimal no especializadas. A partir de ellas se forma forman las colonias osteoprogenitoras, ya comprometidas hacia una diferenciación en células formadoras de hueso, con un potencial de proliferación y diferenciación más limitado hacia condroblastos, osteoblastos y adipocitos en base a estimulaciones específicas. Persisten incluso en el adulto y se encuentran en casi todas las superficies libres de los huesos: trabéculas de cartílago calcificado, canales de Havers, capa interna del periostio y endostio. Son más activas durante la fase de crecimiento de los huesos y en los fenómenos de reparación de lesiones óseas.

1. 1. 2. Osteoblastos

La función principal del osteoblasto es la formación del tejido óseo. Los osteoblastos se encuentran en contacto directo con las superficies óseas formando grupos de una sola capa de espesor. Cuando están activos, su núcleo se encuentra en el extremo más alejado de la superficie ósea sobre la que se asientan (Imagen 1). Al segregar los materiales de la matriz ósea y ésta se mineraliza, se convierten en osteocitos al quedar atrapados en la misma (Imagen 3).

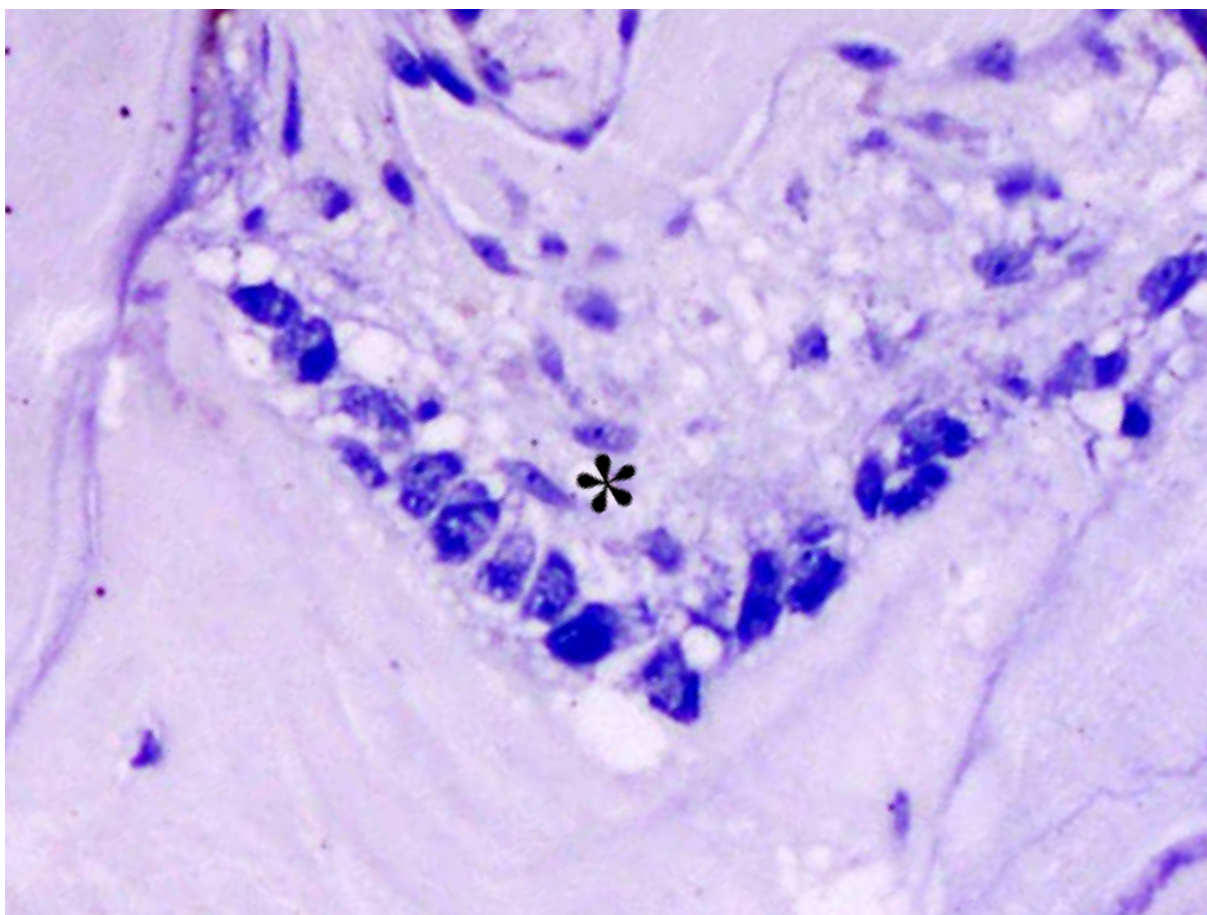


Imagen 1: Capa de osteoblastos sobre partícula de hueso bovino anorgánico (Galindo-Moreno, Moreno-Riestra, et al., 2011).

Los osteoblastos proceden de células osteoprogenitoras de la médula ósea y el periostio que se transforman en preosteoblastos gracias a la actividad de distintos factores de crecimiento, como proteínas morfogenéticas óseas, hormona paratiroidea, vitamina D, factor del crecimiento fibroblástico, factor de crecimiento derivado de las plaquetas y factor de

crecimiento transformante- β . La hormona paratiroidea (PTH) es sin duda el factor sistémico más potente que induce *in vivo* la diferenciación y proliferación de las células del linaje osteoblástico gracias a que éstas células poseen receptores específicos para la PTH que estimula la producción de factor de crecimiento relacionado con la insulina tipo I (IGF-I) (Pfeilschifter et al., 1995; Watson et al., 1995), que, a su vez, estimula la proliferación de los osteoblastos y sus precursores por un mecanismo autocrino. La función de los osteoblastos está, además, afectada por otros factores sistémicos como la 1-25 dihidroxivitamina D₃ y locales como la interleuquina 1 (IL-1), el factor de necrosis tumoral (TNF) y el factor transformante beta (TGF- β), entre otros (Puzas, 1993). Más aún, los osteoblastos producen también factores de crecimiento con efectos autocrinos y paracrinos sobre el crecimiento óseo. Así, a través de la síntesis de citoquinas específicas como el ligando del receptor del factor nuclear kappa-B (RANKL) median en la reabsorción llevada a cabo por los osteoclastos y en la hematopoyesis (factor estimulante del crecimiento de colonias de granulocitos y macrófagos, GM-CSF; y de macrófagos, M-CSF) (Jilka, 1998; Torres García-Denche, 2006).

La principal función de los osteoblastos es la de secretar los componentes de la matriz como el colágeno tipo I, proteoglicanos, osteocalcina, fosfatasa alcalina, osteonectina y osteopontina. Durante éste proceso, los osteoblastos se disponen formando el frente de mineralización, también llamado borde osteoide. Se disponen en forma cúbica o prismática y emiten prolongaciones cortas y finas que se unen entre sí. La microscopía electrónica de transmisión (TEM) (Imagen 2) demuestra que los osteoblastos presentan un Aparato de Golgi muy desarrollado, gran cantidad de ribosomas libres, un retículo endoplásmico rugoso dilatado y gran cantidad de mitocondrias que acumulan los gránulos de fosfato cálcico. Éstos gránulos se transforman en las vesículas de calcificación al salir al exterior de la célula. Al unirse a las fibras de colágeno las vesículas de calcificación provocan la mineralización de la matriz.

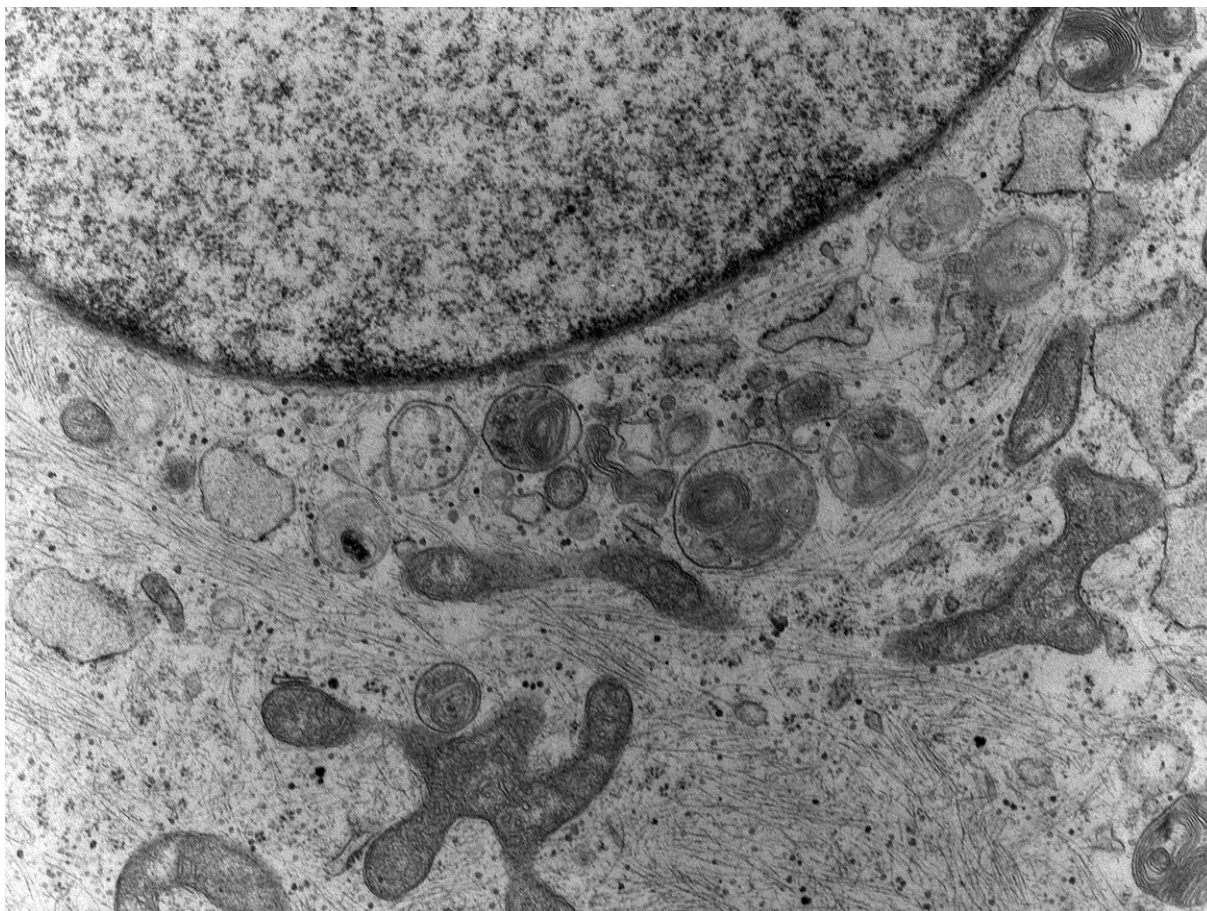


Imagen 2: Detalle de un osteoblasto. Cercano al núcleo, se observa el Aparato de Golgi de contenido gris claro. El resto del citoplasma está ocupado por el RER y vesículas diversas (TEM 9100X) (reproducido con permiso, (Padial Molina, 2010)).

Los osteoblastos pasan sucesivamente por los siguientes estadios funcionales (Lian and Stein, 1992; Stein and Lian, 1992; Owen et al., 1990): 1) Proliferación celular y síntesis de los componentes orgánicos de la matriz ósea; 2) Maduración de la matriz ósea; 3) Depósito de mineral.

1. 1. 3. Osteocitos

A medida que los osteoblastos liberan matriz y ésta se mineraliza quedan incluidos en el espesor de la matriz momento en que pasan a denominarse, y comportarse, como osteocitos (St John et al., 2014) (Imagen 3).

-

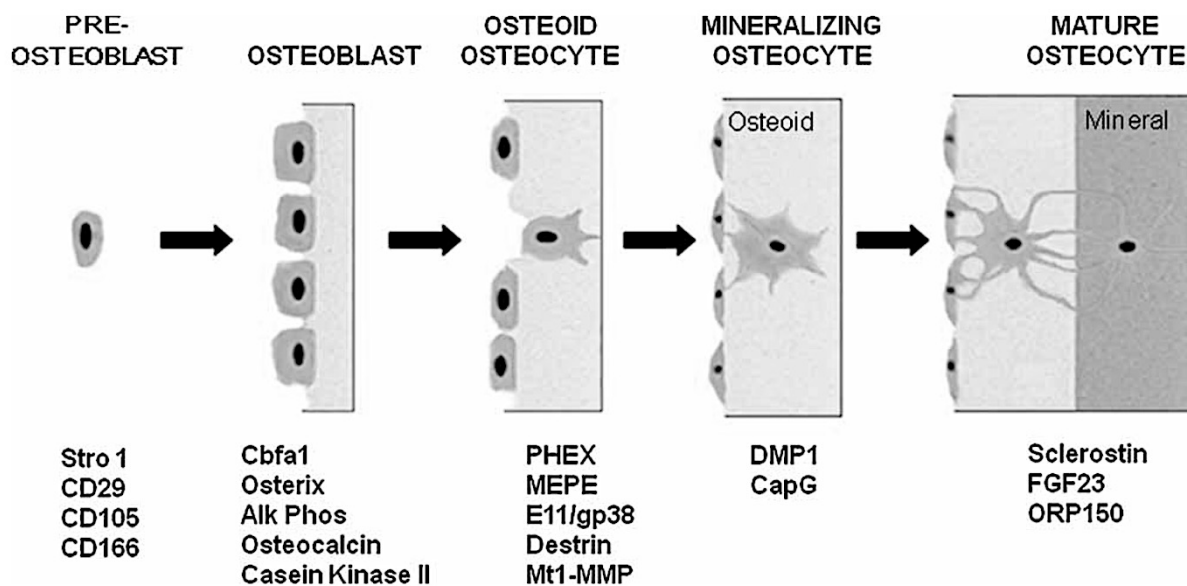


Imagen 3: Expresión de marcadores durante la transición de osteoblasto a osteocito (Bonewald, 2011).

Los osteocitos se hallan en contacto con las células de la superficie y entre sí a través de las prolongaciones osteocitarias, que son prolongaciones tubulares de su citoplasma que recorren la matriz ósea en diversas direcciones (Imagen 4), conectando de éste modo las cavidades de la matriz ósea que contienen el cuerpo celular del osteocito, denominadas lagunas osteocitarias. Los canalículos que contienen sus prolongaciones citoplásmicas se denominan conductos calcóforos. Forman un sistema lleno de líquido intersticial usado como vía de intercambio de metabolitos entre las células y el espacio perivascular más próximo. La capacidad de difusión de nutrientes siguiendo ésta vía es de 100 μm , distancia a la que debe existir un vaso sanguíneo que permita la supervivencia del sistema (Lakey et al., 2000). En los puntos de contacto entre las prolongaciones citoplásmicas de los osteocito existen unos pequeños canales intercelulares que permiten el paso de iones inorgánicos y moléculas hidrosolubles de una a otra célula posibilitando así la comunicación intercelular.

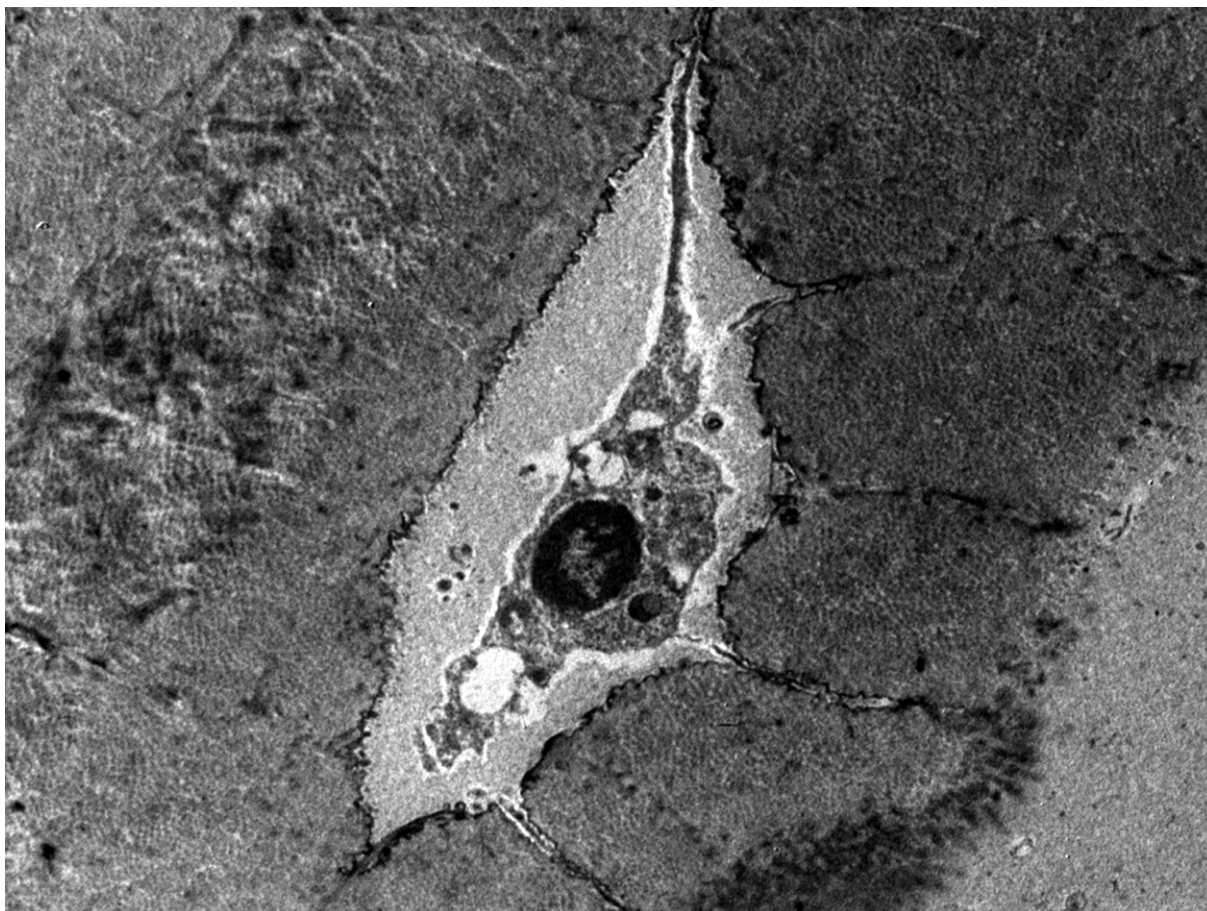


Imagen 4: Osteocito en el interior de una laguna. Se observan las prolongaciones del cuerpo celular penetrando en el interior de varios conductos calcóforos (TEM 5500X) (reproducido con permiso, (Padial Molina, 2010)).

Se han atribuido múltiples funciones al osteocito, llegando incluso a ser considerado como la célula más importante del tejido óseo (Bonewald, 2006; Bonewald, 2011). Su función principal es, sin duda, la de mantener el intercambio de nutrientes y productos de desecho del tejido óseo. Además, sirven como medio de intercomunicación con el tejido óseo a través de las prolongaciones osteocitarias. Los osteocitos no intervienen en la síntesis de matriz en proporciones importantes, pero sí en su mantenimiento ya que ocupan una situación ideal como detectores del estrés mecánico y las microlesiones de la matriz. Así, son capaces de transmitir éstas señales a las células de revestimiento que utilizarían la información recibida para modular localmente el remodelado (Aubin et al., 1993).

1. 1. 4. Osteoclastos

Son células multinucleadas (Imagen 5) procedentes de la unión de monocitos. Cuando éstos activados, emigran al tejido óseo y se fusionan gracias a la expresión de moléculas de adhesión de la familia de las caderinas en su membrana (Parfitt, 1994). Constituyen el sistema fagocítico del hueso (macrófago específico). Su citoplasma es acidófilo y presenta numerosas vesículas (Gonzalez Macias and Serrano Figueras, 1995). Aparecen aislados o en grupos poco numerosos sobre las superficies óseas. Derivan de células madre hematopoyéticas a través de células formadoras de colonias de granulocitos y macrófagos (CFU-GM) activadas por el factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF).

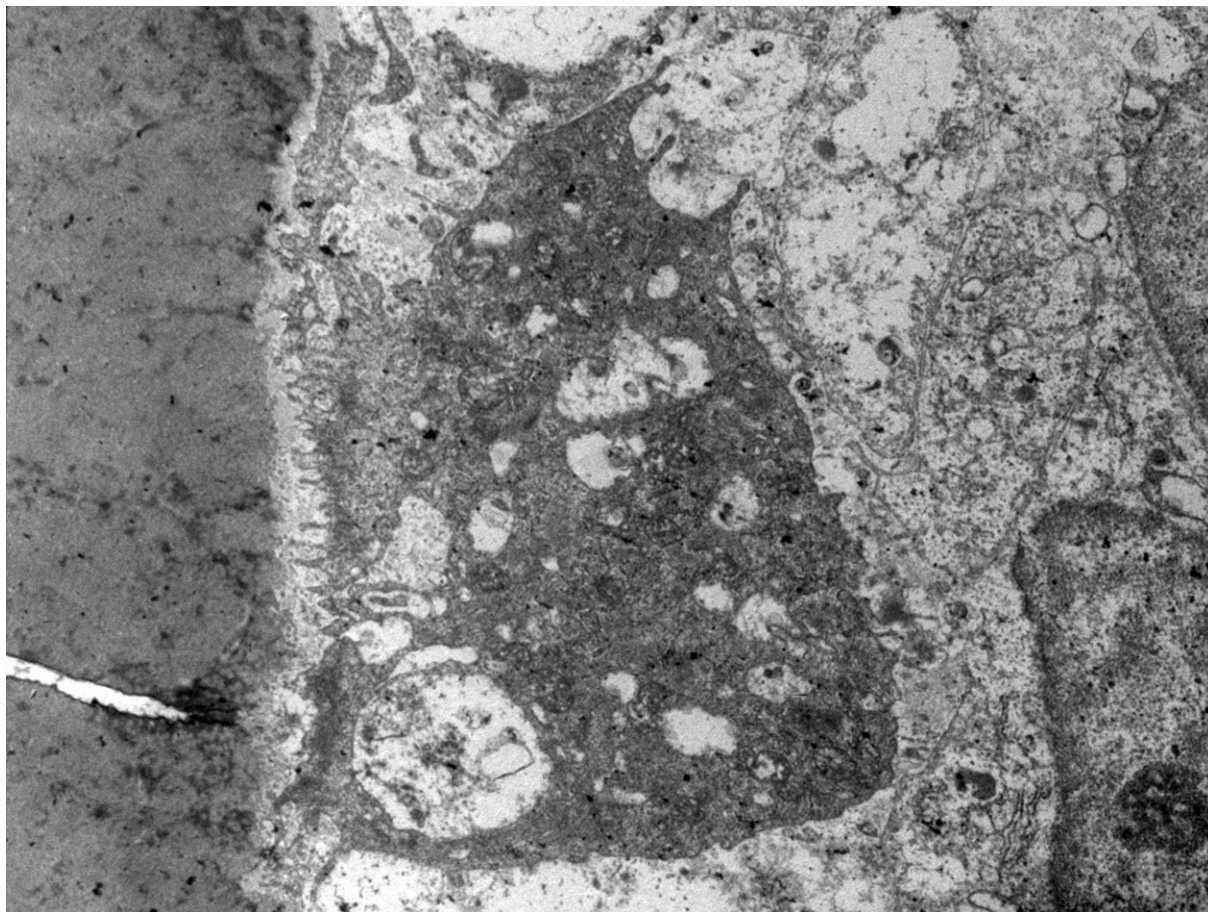


Imagen 5: Osteoclasto activo. Obsérvese el borde en cepillo en la parte central y la zona de sellado en ambos márgenes (TEM 4500X) (reproducido con permiso, (Padial Molina, 2010)).

En el hueso cortical no existe médula ósea por lo que se piensa que los osteoclastos encargados de su remodelación pasarían a la circulación desde la médula ósea y regresarían al microambiente óseo por diapédesis mediante la expresión en su membrana de anexina II (Parfitt, 1994).

La actividad resorptiva de los osteoclastos y la osteoclastogénesis parecen ser activadas, entre otras, por la IL-1, IL-6 e IL-11, producidas por células de estirpe osteoblástica (Elias et al., 1995; Manolagas and Jilka, 1995) estimuladas por hormonas como la PTH y la 1-25 dihidroxivitamina D₃ y por factores locales como TNF. Otros modelos de regulación osteoclástica propuestos incluyen la regulación local de su actividad funcional mediante el calcio liberado durante la reabsorción. Este calcio libre puede penetrar en el interior del osteoclasto a través de los canales de Ca⁺⁺ e inhibir la actividad reabsorptiva (Alberts et al., 1994). Además, también existen enterrados en la matriz numerosos factores de crecimiento de origen osteoblástico que son liberados durante la reabsorción. Éstos factores parecen ser importantes en el mantenimiento de la actividad de los osteoclastos.

La separación de las células de revestimiento alrededor de la matriz mineralizada al modificarse la conformación de su citoesqueleto por acción de la PTH induce la adhesión de los precursores de los osteoclastos a la matriz ósea gracias, entre otras, a las integrinas $\alpha_2\beta_1$ y $\alpha_v\beta_3$ que interaccionan con el colágeno y con la vitronectina, osteopontina y sialoproteína ósea, respectivamente, (Parfitt, 1994).

La zona de su membrana que entra en relación con la matriz ósea presenta un aspecto característico fruncido (Imagen 5). A ambos lados de ésta zona, la membrana se aplana y se adhiere más íntimamente a la matriz conformando la zona de sellado, generalmente libre de organelas, por lo que se conoce como zona clara (Gurley and Roth, 1992). La zona clara es abundante en microfilamentos de actina por lo que parece ser relevante en la capacidad migratoria del osteoclasto, generalmente conocido como movimiento en cepillo. Dicho movimiento se produce en respuesta a fosfatasa ácida resistente al tártaro (TRAP) sobre una extensión determinada denominada dominio osteoclástico (Mundy, 1993).

Tridimensionalmente, la adhesión del osteoclasto a la matriz mineralizada se configura en forma de rodete o ventosa que lo mantiene en contacto directo con la superficie mineralizada. Así, el espacio entre la membrana fruncida y la matriz ósea queda convertido en un microambiente aislado del intersticio medular en el que los osteoclastos reabsorben el hueso, efecto que se produce en dos fases. Primero solubilizan el mineral y luego digieren la matriz orgánica (Gurley and Roth, 1992; Mundy, 1993). Para ello, el osteoclasto acidifica el microambiente creado entre la matriz ósea y su membrana fruncida mediante el bombeo de iones H^+ , con lo que se consigue un pH de 4 aproximadamente. Para ello, la anhidrasa carbónica del citoplasma del osteoclasto cataliza la reacción entre el CO_2 y el H_2O dando lugar a CO_3H_2 que se disocia en CO_3H^- y H^+ . El H^+ es bombeado activamente hacia la matriz ósea a través de la membrana plegada mediante una bomba de protones dotada de una ATP-asa específica. El CO_3H^- es expulsado fuera de la célula a través de la superficie opuesta donde es intercambiado activamente por Cl^- (Mundy, 1993).

Una vez eliminado el mineral, una serie de colagenasas ácidas y otras enzimas proteolíticas de origen lisosómico del grupo de las cisteín-proteasas como la catepsina y, sobre todo, la TRAP se encargan de digerir la matriz orgánica. Es por esto que dichos marcadores, catepsina y TRAP, son a menudo utilizados como marcadores de actividad osteoclástica (Imagen 6).

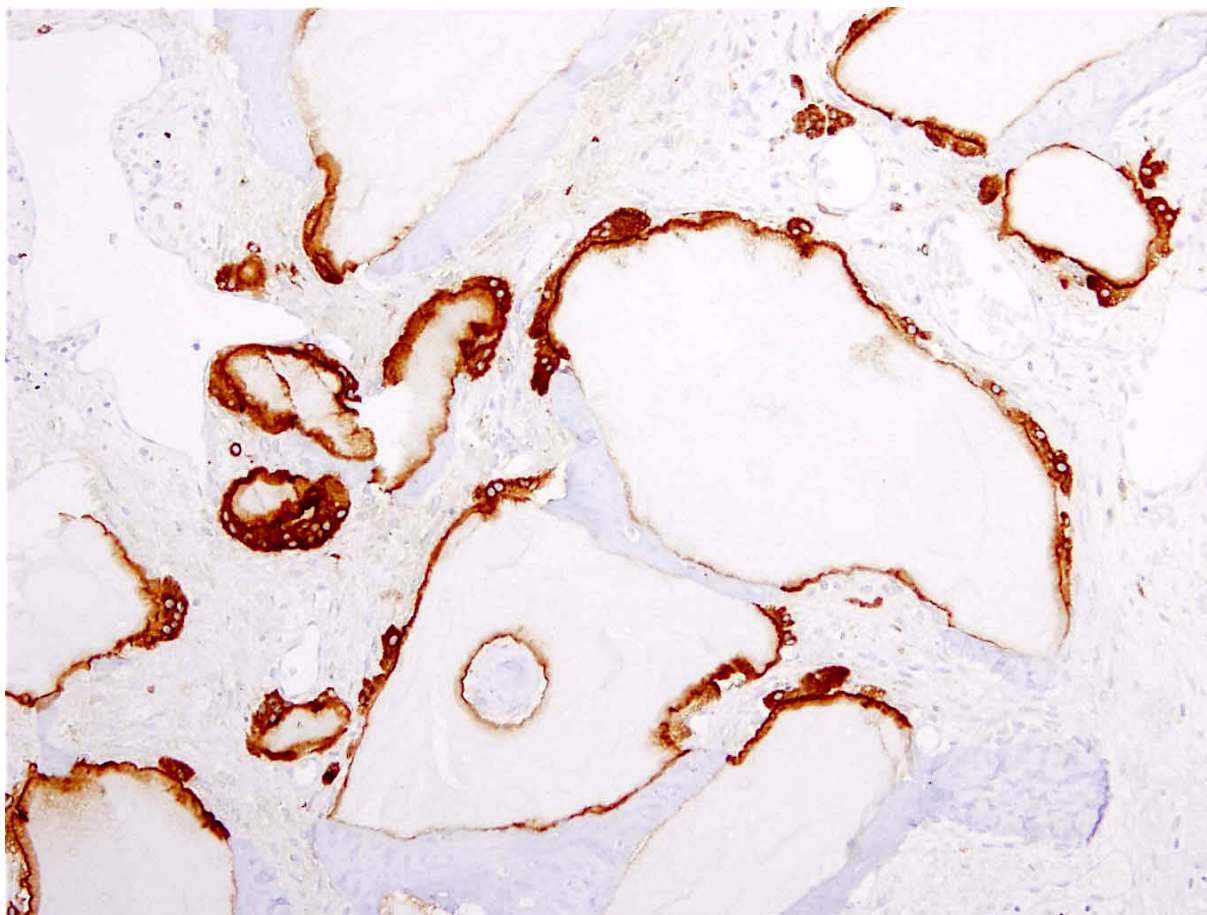


Imagen 6: Expresión de TRAP en células multinucleadas actuando frente a partículas de hueso bovino anorgánico (Galindo-Moreno, Moreno-Riestra, et al., 2011).

1. 2. Matriz extracelular

1. 2. 1. Fase orgánica

La matriz orgánica representa el 35% del peso óseo deshidratado. Está formada en un 90% por colágeno tipo I (Termine, 1993). Las fibras de colágeno se disponen en láminas paralelas entre sí pero en ángulo agudo con respecto a las de las láminas contiguas lo que determina que al observar hueso laminar mediante luz polarizada se alternen láminas claras o birrefringentes (orientadas perpendicularmente a luz) con las oscuras o no birrefringentes (orientadas en ángulo más o menos agudo con respecto a la luz polarizada) (Imagen 7).

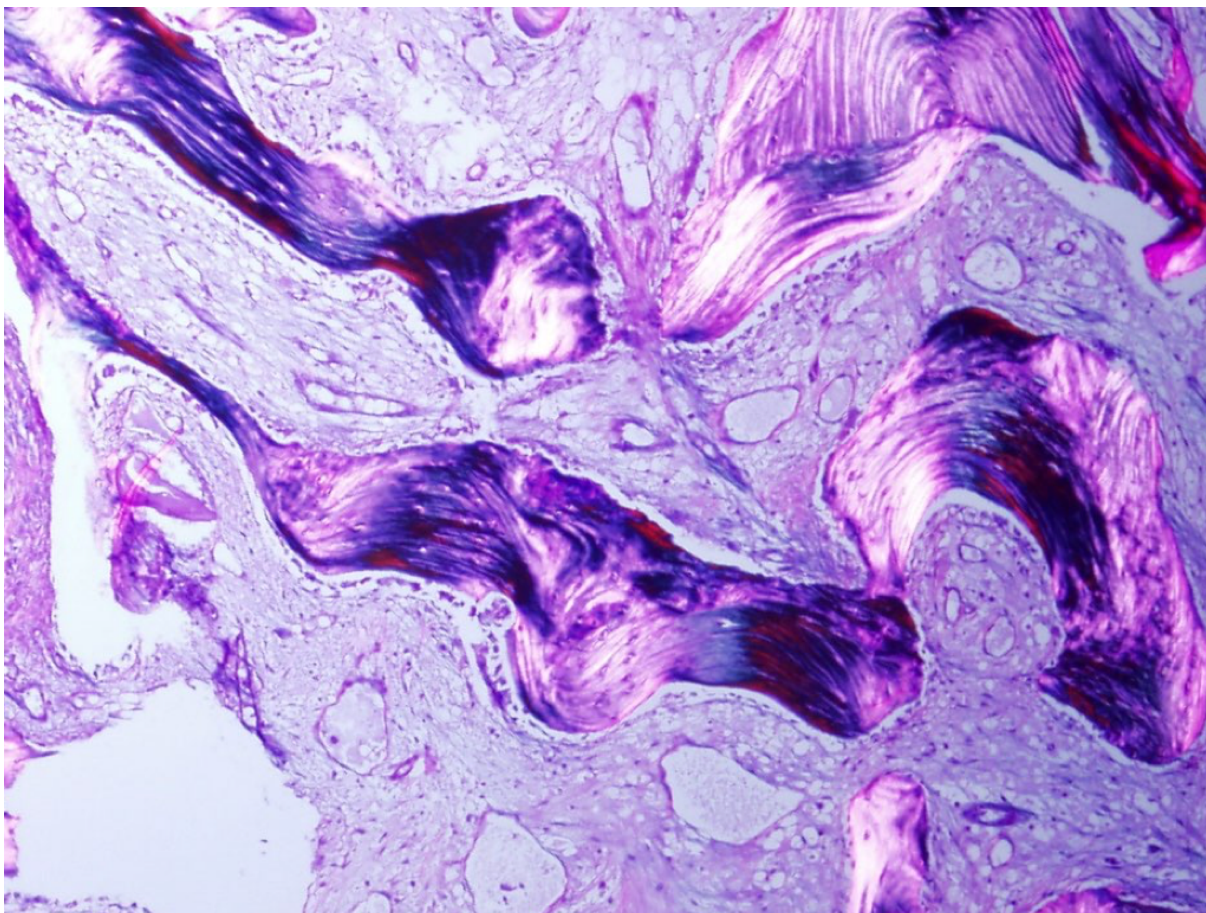


Imagen 7: Láminas birrefringentes de color claro que se alternan con láminas paralelas de color oscuro (PAS 100X). Obsérvese además las diferentes direcciones por grupos de fibras.

En el hueso embrionario o inmaduro las fibras se organizan de forma desordenada (hueso plexiforme) con lo que no se muestra alternancia de bandas claras y oscuras sino un aspecto fibrilar (Gonzalez Macias and Serrano Figueras, 1995). En el esqueleto adulto normal, éste tipo de hueso plexiforme es prácticamente inexistente pero puede formarse de nuevo cuando la producción de matriz se ve acelerada (callos de fractura, consolidación de injertos, etc...).

El osteoide es otro componente muy importante de la matriz ósea no mineralizada. Constituye menos del 1% en volumen del total (Gonzalez Macias and Serrano Figueras, 1995). El osteoide puede observarse en forma de ribetes finos de unas 10 micras de espesor (Imagen 8) revistiendo la superficie de algunas trabéculas y tapizando algunas cavidades intracorticales. Es formado por los osteoblastos antes de la mineralización.

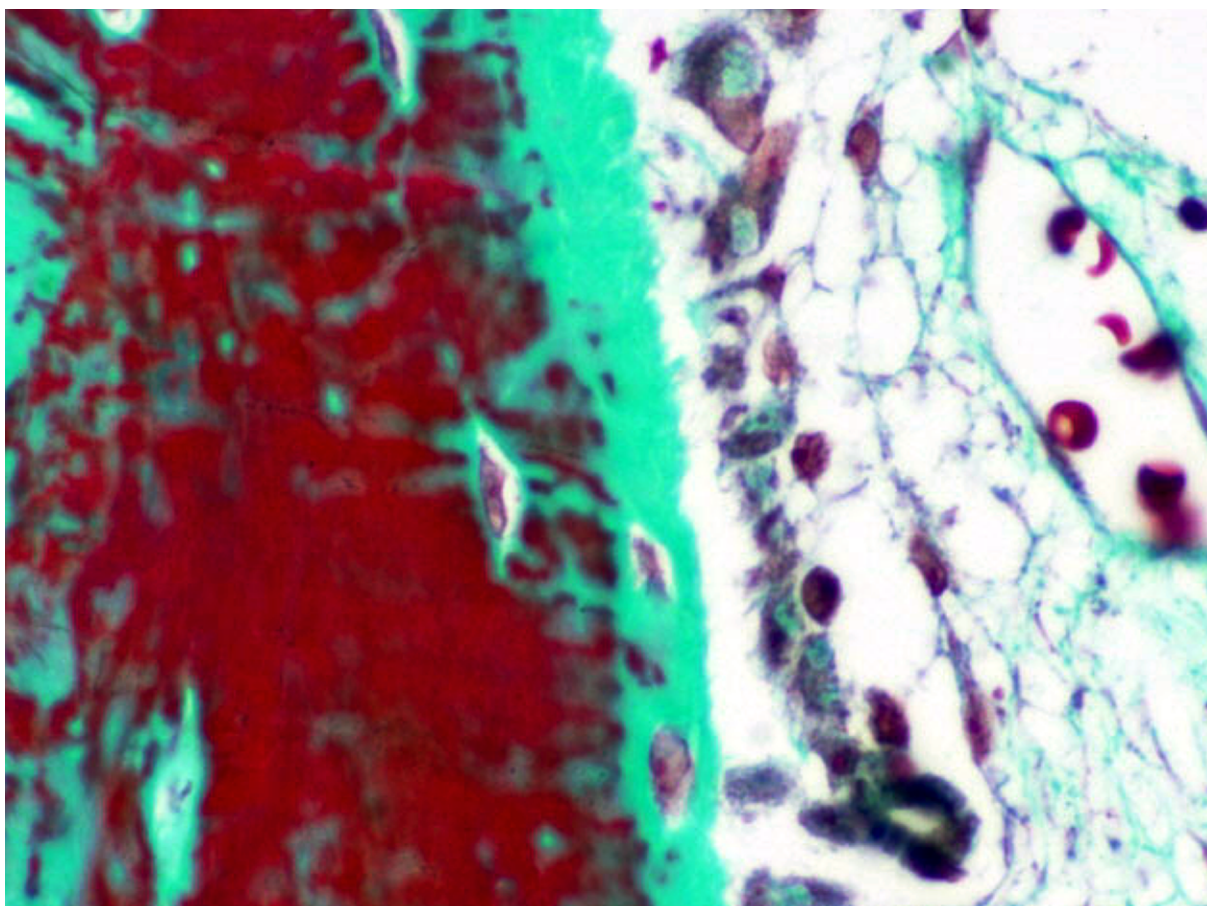


Imagen 8: Ribete de osteoide (franja verde central) sobre hueso mineralizado (rojo) (Tricrómico de Masson 200X). Obsérvese la cercanía de un vaso sanguíneo y la disposición del frente de mineralización (reproducido con permiso, (Padial Molina, 2010)).

En la matriz orgánica existen, además, un amplio abanico de proteínas no colágenas con mayor interés biológico si cabe que el propio colágeno. Esta matriz constituye el almacén para la sedimentación de los cristales de fosfato cálcico. Además, actúa como medio de unión a superficies libres (línea de reabsorción ósea, biomateriales, etc.) (Tabla 2). También, la matriz extracelular proporciona señales reguladoras mediante proteínas como las proteínas morfogenéticas óseas (BMPs) y otros factores de crecimiento.

Tabla 2: Proteínas no colágenas de la matriz extracelular ósea (Torres García-Denche, 2006; Tresguerres, 1999).

Proteoglicanos	Condroitín-sulfato Decorina Biglicano Hialuronato
Proteínas con ácido γ-carboxiglutámico	Osteocalcina
Glicoproteínas	Osteonectina Fosfatasa alcalina Proteínas con RGD: Fibronectina Trombospondina Osteopontina Vitronectina Sialoproteínas óseas
Proteínas del plasma	Albúmina 2-HS-glicoproteína
Factores de crecimiento	IGF-I y II PDGF TGF- β FGF

De todas ellas, las más importantes con sus correspondientes funciones, a modo de resumen, son:

- *Osteocalcina*: sintetizada por los osteoblastos y plaquetas. Es dependiente de las vitaminas D y K. Su función es ligar calcio durante el proceso de mineralización. Se produce en etapas finales de la osteogénesis. Por tanto, su detección demuestra una fase avanzada de la diferenciación celular.
- *Osteonectina*: presenta gran afinidad por el colágeno tipo I, el calcio y la hidroxiapatita además de favorecer la adhesión y la agregación celular.
- *Fosfatasa alcalina*: libera el fosfato inorgánico necesario para la mineralización, catalizando la hidrólisis de ésteres de fosfato a pH alcalino.
- *Fibronectina, osteopontina y vitronectina*: todas ellas con la secuencia Arg-Gly-Asp (RGD) específica para la unión a integrinas, con lo que intervienen en la comunicación matriz-célula.
 - o La *fibronectina* es producida en cartílago, hueso y médula ósea. Una vez sintetizada por los osteoblastos, participa en la organización del osteoide.
 - o La *osteopontina* se une fuertemente a la hidroxiapatita (HA) sirviendo como mediador de adhesión de diferentes tipos celulares.
 - o La *vitronectina* es una proteína cuya principal función es como medio de anclaje celular siendo de las más relevantes en la adhesión a superficies biocompatibles.

1. 2. 2. Fase inorgánica

Esta parte del tejido óseo está formada sólo por sales minerales constituyendo el 65% del peso del hueso en seco. Entre ellas se encuentran, principalmente, el calcio, fosfato y carbonato (10:6:1) que se deposita primero como fosfato cálcico amorfo para posteriormente ser reorganizado a nivel molecular en forma de pequeños cristales hexagonales de

-

hidroxiapatita $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$ (HA). En su forma final, la HA forma placas que se disponen paralelas y asociadas a las fibras colágenas. En el proceso intervienen, como se ha mencionado, principalmente la fosfatasa alcalina que inicia la cristalización del calcio y el fósforo así como otras proteínas secretadas por los osteoblastos como la osteopontina, la osteonectina y la sialoproteína ósea.

BIODINÁMICA DEL TEJIDO ÓSEO

El tejido óseo está constituido por matriz extracelular en su mayor parte. A pesar de esto, es uno de los sistemas más dinámicos del organismo con fenómenos de crecimiento, modelado, remodelado y reparación. Las fases de remodelado y reparación ósea son las más relevantes para el presente trabajo.

1. 1. Remodelado óseo

En el adulto, cerca de un 8% del tejido óseo es renovado anualmente (Serrano and Mariñoso, 1990). Además de por el necesario balance de minerales de los que el hueso es el principal reservorio (homeostasis fosfocálcica), la adaptación del hueso a las cargas mecánicas hacen que el hueso sufra un continuo, local y cíclico proceso de remodelado.

El remodelado se produce en grupos formados por un osteoclasto, un osteoblasto, un preosteoblasto y un macrófago, lo que se denomina Unidad Básica Multicelular (o basic multicellular units, BMU) (Eriksen et al., 1994). Cada ciclo de remodelado consta de tres fases: reabsorción, reposo o inversión y formación. En la fase de reabsorción, un grupo de osteoclastos se diferencia a partir de sus precursores y erosiona una superficie ósea dando lugar a imágenes en sacabocados conocidas como lagunas de Howship. Tras ésta primera fase, los osteoclastos son eliminados por apoptosis que es seguida por una fase de aparente inactividad, la fase de reposo o inversión. En éste momento, el límite entre el hueso preexistente y el nuevo es identificable como una línea ondulada denominada superficie de inversión o de cemento (Imagen 9). A continuación, un grupo de osteoblastos se diferencia a partir de sus precursores y deposita hueso nuevo la zona excavada por los osteoclastos en la fase de formación, primero con la formación de osteoide (Imagen 8) que sufre un proceso de

cambios en su composición y estructura que la hacen apta para el depósito de mineral. Estos cambios duran unos 10 a 20 días, conocido como “Mineral Lag Time”. A medida que avanza, se produce un plano de barrido de 2 a 3 micras de espesor compuesto en parte por mineral amorfo y que se denomina frente de mineralización que va dejando matriz mineralizada a medida que avanza (Serrano and Mariñoso, 1990).

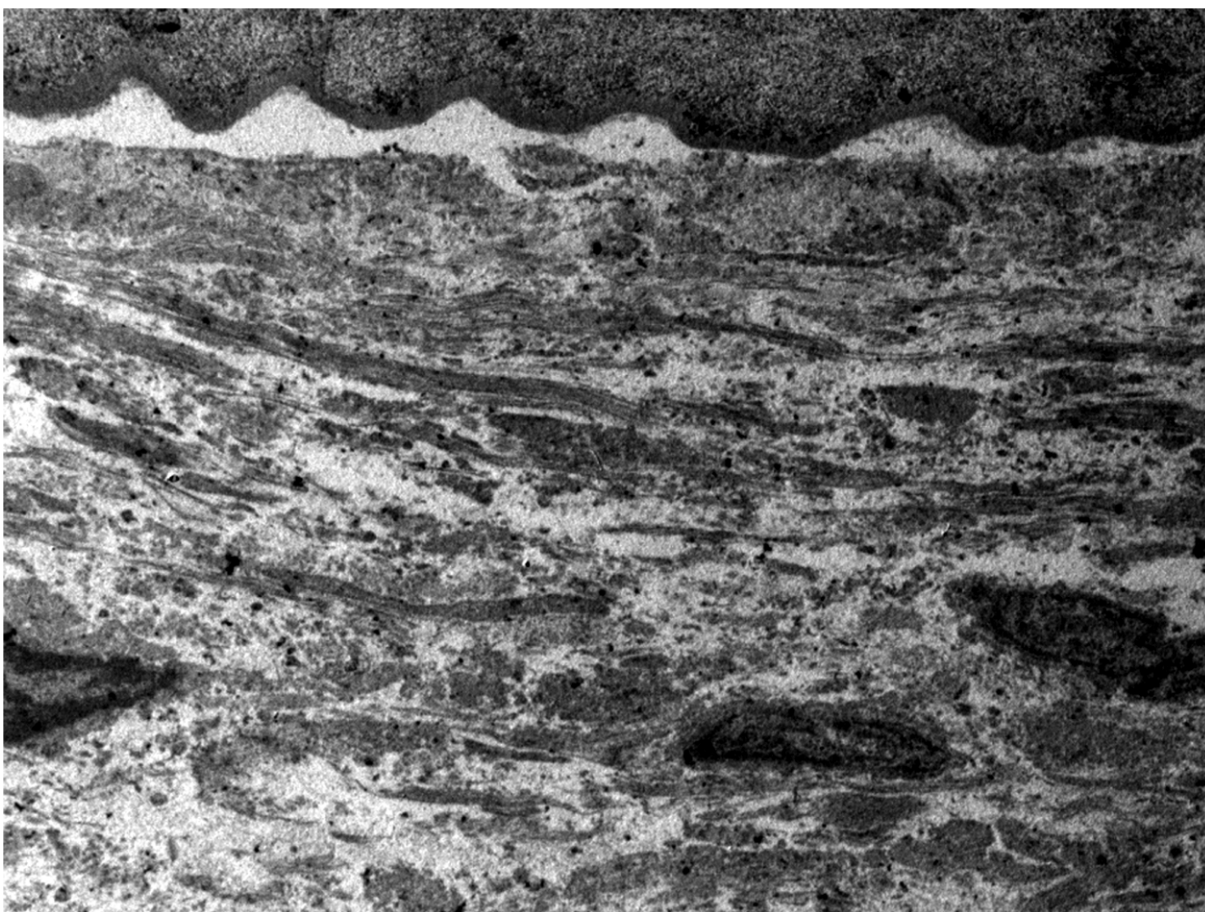


Imagen 9: Microscopía electrónica de transmisión en la que se observa la superficie de inversión (Padial Molina, 2010).

1. 2. Reparación ósea

El único tejido del organismo capaz de repararse a sí mismo de manera completa consiguiendo su *restitutio ad integrum* a través de la reactivación de los procesos que tienen lugar durante la embriogénesis es el tejido óseo. Así, cuando en un hueso se supera su resistencia mecánica aparece una línea de fractura en la que se producirá un hematoma. Dicho

hematoma es reabsorbido por macrófagos antes de que aparezcan, procedentes de ambos lados de la línea de fractura, las células formadoras de hueso. En un primer lugar se establecen puentes de tejido óseo inmaduro sin orientación espacial definida (callo de fractura) que unen entre sí los extremos del hueso fracturado y que, posteriormente, a través de un proceso de modelado, es sustituido por hueso nuevo laminar con orientación acorde a las líneas de fuerza que actúan sobre la zona (Bullough and Vigorita, 1996). Tanto el proceso de curación ósea periimplantaria como alrededor de un injerto óseo siguen una secuencia similar.

1. 3. Factores reguladores

La vascularización del tejido en formación es fundamental para un desarrollo óseo, remodelación y reparación normales ya que aporta las células sanguíneas, oxígeno, minerales, iones, glucosa, hormonas y factores de crecimiento necesarios para que se produzcan los procesos mencionados. La neovascularización de un tejido está mediada por principalmente por el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), entre otros. En cualquier caso, los frentes de mineralización y el depósito de osteoide, como ya se ha mencionado, siempre se producen de forma orientada hacia los vasos sanguíneos existentes (Imagen 8).

El tejido conectivo no mineralizado juega un papel fundamental en la revascularización en procesos de reparación/regeneración ya que la presencia de vasos sanguíneos proporciona un nivel apropiado de tensión de oxígeno que influencia la diferenciación de células mesenquimales hacia poblaciones osteoprogenitoras (Pacicca et al., 2003). Así, la angiogénesis y la osteogénesis serían procesos ligados que ocurren en fases secuenciales (Carano and Filvaroff, 2003). De forma resumida, la angiogénesis ocurre primero, seguida de un crecimiento celular orientado hacia los nuevos vasos (Imagen 8). Una vez que se establece un apropiado aporte sanguíneo, la diferenciación endotelial se paraliza y comienza el proceso osteogénico.

En un estado inicial tras el inicio del proceso reparativo/regenerativo, la hipoxia debida a la falta de aporte de oxígeno y a la intensa actividad celular media una respuesta estimuladora de la formación de vasos sanguíneos por la expresión de VEGF y supresión de angiopoiteina-1, que promueve a su vez una mayor liberación de VEGF (Lakey et al., 2000). VEGF además ha demostrado aumentar la migración y diferenciación de osteoblastos y precursores

osteoblásticos (Murphy et al., 2004). En este primer momento gracias a VEGF, la presencia de formaciones vasculares permitirá la nutrición de las células ya presentes por lo que la distribución de los vasos sanguíneos es un parámetro importante, considerando que el nuevo hueso se orientará hacia dichos vasos sanguíneos por la polarización de los osteoblastos hacia ellos (Davies, 2003). Este efecto se debe, por un lado, a que los osteoblastos son células muy demandantes metabólicamente, y, por otra parte, los osteoblastos son fuente de factores vasoactivos, tales como endotelinas y óxido nítrico, que a su vez regularán el flujo sanguíneo (Kitten and Andrews, 2001).

En estudios con injertos óseos para la formación de nuevo hueso se ha podido establecer una correlación entre el número de vasos sanguíneos en el tejido no mineralizado y la tasa de hueso neoformado (Yao et al., 2004). Además, se ha demostrado que la densidad de microvasos (MVD) es mayor en tejidos injertados que en hueso control, con diferencias significativas tanto en regeneración sobre la cresta alveolar (Piattelli et al., 2002) como en seno maxilar injertado (Degidi et al., 2007). Otros estudios analizando la MVD con marcadores específicos de células endoteliales como el CD34 han encontrado también diferencias significativas entre hueso nativo y hueso injertado, existiendo además correlación entre la mayor densidad vascular y la mayor proporción de tejido no mineralizado. Por el contrario, se observó menor densidad vascular en pacientes con antecedentes de enfermedad periodontal o consumo de tabaco o alcohol (Galindo-Moreno, Padial-Molina, et al., 2010).

Con respecto a la vascularización del hueso lamelar maduro, ésta se realiza a través de los canales Haversianos y de Volkmann. Su desarrollo es fundamental en los tejidos en reparación, no solo por el aporte de oxígeno y nutrientes a la zona, sino también porque es necesario para eliminar los detritus y otros productos de desecho del metabolismo celular. Es sabido y se mencionó anteriormente que los osteocitos necesitan la presencia de vasos sanguíneos a una distancia no superior a 100 μm para garantizar su supervivencia (Lakey et al., 2000). De este modo, la formación de un sistema canalicular organizado y bien distribuido, regulado por la naturaleza del nuevo hueso, que permita mantener la irrigación y el complejo sistema de señalización molecular que promueve el mantenimiento y la adaptación ósea es completamente necesaria (Huang et al., 2005). Trabajos previos han evidenciado el mecanismo

de revascularización y formación de canales haversianos dentro del hueso vital, de un modo ordenado, formándose los pequeños vasos sanguíneos de un modo alineado, con una distancia armónica, distribuida necesariamente para permitir el aporte vascular a todo el sistema sinectario lacunocanalicular, lo que garantizaría la viabilidad de estos osteocitos, y su adecuada respuesta a los mecanismos adaptativos aplicados sobre este nuevo tejido óseo (Galindo-Moreno, Padial-Molina, et al., 2010; Galindo-Moreno et al., 2013).

Por otro lado, la proporción de tejido no mineralizado juega también un papel fundamental como reservorio de células osteogénicas que interaccionaran con el ambiente (Zerbo et al., 2005), existiendo una correlación directa entre ésta proporción y el número de osteoblastos (Galindo-Moreno, Moreno-Riestra, et al., 2010). Es en el tejido no mineralizado donde se liberan factores como Runx2 o la sialoproteína ósea que favorecen la diferenciación de células madre mesenquimales (Zerbo et al., 2005). Otras proteínas clave en el proceso de remodelación y reparación como la osteopontina juegan un papel primordial en la formación (Yamate et al., 1997), migración (Noda et al., 1998), adhesión (Katayama et al., 1998) y regulación de la actividad de los osteoclastos (Duong and Rodan, 1999).

PÉRDIDA DENTARIA – PÉRDIDA ÓSEA

La pérdida prematura de dientes en los sectores posteriores del maxilar superior supone una situación clínica, en ocasiones, difícil de manejar. Toda pérdida de dientes es siempre seguida por reabsorción del hueso alveolar de mayor o menor magnitud (Araujo and Lindhe, 2005), que se manifiesta dramáticamente en los seis primeros meses tras la pérdida dentaria, tanto en sentido corono-apical como vestibulo-lingual, siendo más intensa en esta última dimensión (Lekovic et al., 1998). Este efecto se debe principalmente a la interrupción de la estimulación funcional del hueso vía ligamento periodontal (Cardaropoli et al., 2003).

Cuando se extrae un diente, el coágulo sanguíneo inicial es sustituido por tejido de granulación mientras el epitelio prolifera para cerrar la herida. Este tejido de granulación es gradualmente sustituido por tejido osteoide desde la base del alveolo. Tras 3 meses, el relleno óseo y la maduración es completa en condiciones normales (Amler, 1969) y prácticamente todos los cambios dimensionales han ocurrido (Schropp et al., 2003). Se ha indicado que estos

cambios suponen una reducción de 3,87mm en sentido buco-lingual, 2,59 y 2,03 mm de reducción de altura bucal y lingual, con una reducción media radiográfica de 1,53 mm y una pérdida de relleno de 2,57 mm (Van der Weijden et al., 2009).

Así, el análisis de la literatura clásica nos confirma que los cambios del hueso alveolar están caracterizados por:

1. Remodelación alveolar intensa hasta 3 meses tras la extracción (Amler, 1969; Johnson, 1969; Schropp et al., 2003).
2. Reducción de altura de un 40% y un 60% en anchura (Ashman, 2000).
3. 23% de pérdida de anchura a 6 meses con hasta el 34% a 5 años (Carlsson et al., 1967)
4. 25% de pérdida de volumen durante el primer año y hasta el 40-60% en 3 años (Tallgren, 1972).
5. La parte más coronal de la pared bucal se pierde por la pérdida del hueso denominado "bundle bone" (Araujo and Lindhe, 2005).
6. La pared bucal se reabsorbe más que la pared palatina (Pietrokovski and Massler, 1967).
7. Se produce una reducción progresiva de la cresta residual de hasta 0,1 mm/año en la maxila y de 0,4 mm/año en la mandíbula (Atwood and Coy, 1971).

Como consecuencia, el tratamiento mediante implantes dentales puede verse comprometido (Block and Kent, 1997), motivo por el cuál se han desarrollado numerosas técnicas encaminadas a preservar o a restaurar una cantidad suficiente de hueso para permitir la rehabilitación estética y funcional de la zona. A pesar de los numerosos estudios orientados a mantener el volumen del hueso alveolar tras la pérdida dentaria, con estudios clásicos como los de Araujo y colaboradores (Araujo et al., 2011; Araujo and Lindhe, 2011), ninguna estrategia ha mostrado aún evidencia clara y predictibilidad. El objetivo, en definitiva, es el de conseguir

-

o acercarse al máximo a los criterios de Goodsell para un tramo edéntulo ideal para la rehabilitación protésica (Goodsell, 1955):

- Adecuado soporte óseo para la prótesis.
- Hueso cubierto de tejido blando.
- Sin protuberancias ni bordes agudos.
- Adecuados surcos lingual y bucal.
- Sin bandas cicatrizales que eviten el asentamiento normal de la prótesis.
- Sin fibras musculares ni frenillos que interfieran con la prótesis.
- Relación maxilo-mandibular satisfactoria.
- Sin protuberancias ni hipertrofias de tejido blando.
- Sin procesos neoplásicos.

Aunque éstos criterios fueron definidos para prótesis removibles, muchos de ellos aún sirven de base para la rehabilitación mediante implantes. En cualquier caso, se busca disponer de un hueso alveolar y tejidos blandos con suficiente calidad y volumen disponible tridimensionalmente que permita la rehabilitación protésica adecuada.

TÉCNICAS DE ELEVACIÓN DE SENO

En el maxilar superior posterior, es posible observar, además de los procesos descritos anteriormente, un aumento en el volumen del seno maxilar, fenómeno conocido como neumatización, y que parece estar mediado por una reabsorción ósea centrífuga desde el interior de la cavidad antral ante la falta de estimulación mecánica intraósea. Ambos procesos hacen que el hueso disponible entre la cresta alveolar y el seno maxilar para la rehabilitación implantes dentales sea limitado o incluso inexistente (Del Fabbro et al., 2008). Por éste motivo, se modificó una técnica originalmente descrita para el tratamiento de infecciones, quistes y

otra patología intrasinusal descrita originalmente por Boyne y James en 1980 (Boyne and James, 1980).

El objetivo principal de la técnica elevación de seno es la formación de nuevo hueso vital dentro del seno maxilar con la capacidad de permitir la osteointegración de implantes y que soporte cargas oclusales funcionales manteniendo la estabilidad a largo plazo. Además, puesto que en muchos casos (cuando la cresta residual es menor a 5mm) es necesario esperar un tiempo entre la colocación del injerto y el implante, ésta técnica quirúrgica se ha convertido en el modelo ideal de investigación de biomateriales para regeneración ósea puesto que durante la colocación del implante se puede obtener una muestra del tejido regenerado sin ningún tipo de objeción desde el punto de vista ético.

1. 1. Alternativas a la elevación de seno

En los casos en los que el hueso disponible es limitado se han propuesto las siguientes alternativas, entre otras:

- Prótesis parcial removible. No aportan, a día de hoy, calidad de vida y mantenimiento de los tejidos a nivel adecuado para ser considerada una opción de tratamiento definitivo.
- Prótesis parcial fija. Además de que no siempre es posible su realización (necesidad de pilar posterior, longitud adecuada del tramo edéntulo, etc.), el éxito a 5-10 años es menor al 70% (Pjetursson et al., 2004a; Pjetursson et al., 2004b; Tan et al., 2004).
- Prótesis con cantiléver. El uso de cantilevers para rehabilitar los sectores maxilares posteriores crea importantes fuerzas no axiales en los dientes o implantes anteriores de soporte, lo que comúnmente da lugar a bajas tasas de éxito, por debajo del 63% a 10 años (Pjetursson et al., 2004a; Pjetursson et al., 2004b; Tan et al., 2004).
- Implantes cortos. Algunos estudios han indicado altas tasas de éxito aunque otros indican una tendencia contraria (Monje et al., 2014; Monje, Fu, et al., 2013; Monje,

Chan, et al., 2013). Así, se han reportado tasas de éxito de hasta el 98% (Fugazzotto, 2008) aunque también tasas de fracaso superiores al 10% (das Neves et al., 2006).

- Implantes inclinados. Aunque se ha considerado una opción adecuada para evitar la elevación de seno (Aparicio et al., 2001; Monje et al., 2012; Testori et al., 2008), se duda de su pronóstico a largo plazo.
- Implantes zigomáticos. Estudios clásicos en este campo han reportado tasas de éxito de hasta el 99.9% (Aparicio et al., 2006). Sin embargo, es una técnica compleja técnicamente y con serias complicaciones potenciales.

El uso de éstas alternativas a la elevación de seno son objeto de continuo análisis (Thoma et al., 2015). Sin embargo, éstas opciones presentan una serie de limitaciones anatómicas y biomecánicas, para cuya solución se han propuesto diversos procedimientos quirúrgicos:

Colocación de injertos en bloque, tipo onlay, para aumentar la disponibilidad ósea al nivel de la cresta alveolar. Es un procedimiento de alta dificultad técnica, cuya indicación dependerá en gran medida del espacio disponible. Además, es un tratamiento comúnmente no muy bien aceptado por el paciente (Keller et al., 1999; Misch and Dietsh, 1994; Schwartz-Arad and Levin, 2005).

Colocación de injertos inlay, tras la realización de una ostectomía LeFort-1. En gran parte de los casos es excesivamente traumático, y también dependiente de la altura protésica remanente (Lekholm et al., 1999).

Colocación de substitutos óseos en bloque o particulados en el interior del seno maxilar, procedimiento originariamente descrito como elevación de seno (Boyne and James, 1980).

Las razones para indicar alguna de éstas técnicas incluyen:

- Baja densidad ósea en el maxilar posterior. Como regla general, la calidad del hueso en el maxilar posterior se ha definido como pobre (Lekholm and Zarb, 1985; Misch, 1990), dando lugar a mayores tasas de fracaso por las malas propiedades biomecánicas (Goodacre et al., 2003). Sin embargo, se ha cuestionado éste planteamiento considerando que, según Davies (Davies, 2003), el hueso trabecular representa un tejido biológicamente superior capaz de promover una mejor y más

rápida cicatrización peri-implantaria en comparación con hueso de mayor densidad pero con menor capacidad de respuesta.

- Fuerzas oclusales. La fuerza oclusal media más alta registrada se localiza precisamente en la zona maxilar posterior: 1550 Pa frente a 293 Pa a nivel anterior (Anderson and Picton, 1958), extremo a tener en cuenta en la planificación protésica.
- Migración de implantes al seno maxilar. De no realizarse alguna técnica de aumento óseo previa a la colocación de implantes, se corre el riesgo de que dichos implantes, por su falta de estabilidad primaria debido a la reducida cantidad de hueso disponible, se desplacen al interior de la cavidad sinusal, generando patología que puede llegar a ser grave (Galindo et al., 2005; Galindo-Moreno, Padial-Molina, et al., 2012; Galindo-Moreno, Padial-Molina, et al., 2011).

1. 2. Técnicas de elevación de seno

La técnica de elevación de seno presenta importantes ventajas frente a las otras alternativas terapéuticas. Toda técnica de elevación sinusal tiene como objetivo la neoformación de un tejido óseo en el interior del seno maxilar, haciendo posible la estabilidad de implantes dentales sometidos a carga funcional. Desde su introducción como una modalidad de aumento óseo pre-implantaria (Boyne and James, 1980), se han propuesto numerosas modificaciones (Nkenke and Stelzle, 2009; Pjetursson et al., 2008; Lundgren et al., 2004; Martos Diaz et al., 2007; Peleg et al., 2004; Soltan and Smiler, 2005; Vercellotti et al., 2001). Entre ellas, de forma resumida y protocolizada, se encuentran las siguientes, considerando la diversa literatura publicada al respecto:

1. 2. 1. Técnica lateral

Es la técnica básica y base para las demás. El procedimiento es el siguiente:

- 1) Crear una ventana en la pared bucal del maxilar posterior para acceder a la membrana de Schneider sin perforarla.

-

- a) Los márgenes de la ventana deben ser:
- i) Superior: a 15mm de la cresta alveolar.
 - ii) Inferior: a 2-3mm por encima del suelo del seno.
 - iii) Anterior: 2-3mm desde la pared anterior del seno o de los dientes adyacentes.
 - iv) Posterior: tan posterior como sea necesario para la colocación de todos los implantes necesarios.
- b) La ventana ósea puede ser eliminada, empujada hacia el interior de la cavidad sinusal o recolectada para su inserción posterior completa o particulada.
- 2) Despegar y elevar la membrana de Schneider para crear el espacio para el biomaterial.
- 3) La colocación simultánea o diferida de implantes depende de la altura de la cresta remanente. Se puede hacer colocación simultánea si dicha cresta es mayor a 5mm en altura (Misch and Judy, 1987; Wang and Katranji, 2008) (Tabla 3).

Tabla 3: Clasificación del hueso remanente crestal e indicación quirúrgica de elevación de seno y colocación de implantes.

Clasificación	Medidas	Colocación de implantes
Misch y Judy (Misch and Judy, 1987)	Clase A: $\geq 12\text{mm}$	Permitida
	Clase B: 10-12mm	Técnica de osteotomos
	Clase C: 5-10mm	Elevación de seno y colocación de implantes
	Clase D: $\leq 5\text{mm}$	Elevación de seno y colocación diferida

Clasificación	Medidas	Colocación de implantes
Wang y Katranji (Wang and Katranji, 2008)	Clase A: ≥ 10 mm de altura, ≥ 5 mm anchura	Permitida
	Clase B: 6-9mm	Técnica de osteotomos
	Clase C: ≤ 5 mm	Elevación de seno y colocación de implantes según estabilidad primaria

-

- 4) Colocar el material de injerto.
- 5) Colocar la membrana de recubrimiento de la zona que evite la invasión de tejido conectivo hacia el injerto.
- 6) Suturar para facilitar el cierre primario de la herida.

1.2.1.1. *Ventajas*

- Visibilidad directa.
- Control de la posición del injerto.

1.2.1.2. *Desventajas*

- Más inflamación y riesgo de infección.
- Más dolor.
- Más tiempo.
- Técnicamente difícil.

1.2.1.3. *Posibles complicaciones*

-

- Perforación de la membrana de Schneider. Es la complicación más común, con una prevalencia de alrededor del 20%, sin bien existe controversia en su relevancia clínica (Pjetursson et al., 2008). La presencia de septos o márgenes afilados al crear la ventana aumentan el riesgo de desgarro de la membrana. Si es menor de 5mm se puede solucionar con sólo colocar una membrana de colágeno (Pikos, 1999; Pikos, 2008), PRP (Choi, Zhu, et al., 2006) e incluso cianoacrilato (Choi, Kim, et al., 2006). Si la perforación es mayor, la cirugía se debería posponer.
- Hemorragia, principalmente de la arteria alveolar postero-superior (Guncu et al., 2011), aunque también puede deberse a la arteria etmoidal y la infraorbitaria.
- Obliteración del seno por bloque del ostium, si se utiliza mucho injerto. De acuerdo con las dimensiones del seno, el volumen medio del injerto a emplear debería no ser mayor a 4.5-5.5cc (Uchida et al., 1998).
- Migración de implantes a la cavidad sinusal (Galindo et al., 2005; Galindo-Moreno, Padial-Molina, et al., 2011; Galindo-Moreno, Padial-Molina, et al., 2012).
- Comunicación oroantral, infección aguda y sinusitis.

1. 2. 2. Técnica de osteotomos

Fue descrita originalmente por Tatum (Tatum, 1986), modificada y publicada por Summers (Summers, 1994a; Summers, 1994c; Summers, 1994b; Summers, 1995) y ampliamente validada clínicamente (Emmerich et al., 2005; Tan et al., 2004). La técnica consiste en la creación de una osteotomía a través de la cresta ósea mediante unos instrumentos específicos (osteotomos) que permiten la elevación de la membrana de Schneider, con o sin el uso simultáneo de biomateriales.

1.2.2.1. Ventajas

- Poco invasiva.
- Se puede hacer con instrumental rotatorio (Cosci and Luccioli, 2000).

-

- Riesgo reducido de inflamación excesiva e infección.
- Mejor postoperatorio.
- Menos tiempo.
- Más económica.

1.2.2.2. *Desventajas*

- No existe control sobre la posición del injerto.
- Se realiza a ciegas.
- No muy bien aceptada por el paciente debido a los golpes necesarios para realizar la elevación.

1.2.2.3. *Posibles complicaciones*

- Perforación de la membrana de Schneider, que además puede pasar inadvertida, principalmente cuando se elevan más de 5 mm (Engelke and Deckwer, 1997).
- Si la angulación del seno es superior a 45º, el riesgo de perforación de la membrana se aumenta.
- Puede inducir síndromes de vértigo por la percusión (Di Girolamo et al., 2005; Su et al., 2008; Kim et al., 2010; Vernamonte et al., 2011).

1. 2. 3. Cirugía piezoeléctrica

La técnica propuesta inicialmente por Vercellotti (Vercellotti et al., 2001) emplea instrumental específico cuya acción de corte se produce por las microvibraciones de una punta metálica que actúa de forma eficaz sobre el tejido mineralizado pero preserva el tejido blando. Se utiliza, por tanto, para la apertura de la ventana ósea.

1.2.3.1. *Ventajas*

-

- Mejor control de la técnica.
- Previene el daño de los tejidos blandos, incluyendo la membrana de Schneider.

1.2.3.2. *Desventajas*

- Costosa por el instrumental específico y las puntas que se necesitan.

1. 2. 4. Técnica de balón

Se trata de una modificación de la técnica lateral en la cuál se emplea un dispositivo hidrodinámico para el despegamiento y elevación de la membrana de Schneider (Kfir et al., 2006; Soltan and Smiler, 2005).

1.2.4.1. *Ventajas*

- Bajo riesgo de perforación.
- Acceso y elevación de la membrana poco brusco.

1.2.4.2. *Desventajas*

- Cada paciente requerirá distintas presiones para el despegamiento de la membrana, con el riesgo de desgarros en caso de presión excesiva.
- Requiere instrumental adicional lo que incrementa los costes.

1. 2. 5. Técnica subantral

Se trata de una técnica de acceso lateral y crestal combinado en la que se insertan los implantes de forma que sostengan la ventana lateral empujada hacia el seno en posición elevada sin colocación de injerto, siendo ésta su única ventaja, si bien sería discutible la regeneración que se pueda conseguir en la zona (Arana and Sarnachiaro, 2005; Lundgren et al., 2004; Thor et al., 2007; Lundgren et al., 2008).

-

1. 2. 6. Técnica de rascador

Se trata de una modificación de la técnica lateral. Mediante ésta técnica, la pared bucal de acceso al seno es creada mediante un rascador de hueso capaz de recolectar el hueso cortical hasta exponer la membrana de Schneider. Este hueso puede ser posteriormente introducido en el interior de la cavidad sinusal para mejorar las propiedades globales del injerto (Galindo-Moreno et al., 2007).

1.2.6.1. Ventajas

- Menor tiempo quirúrgico, lo que reduce también el riesgo de infección e inflamación excesiva.
- Bajo riesgo de perforación de la membrana.
- Poco demandante técnicamente.
- Permite la colección de hueso que aportará capacidad osteogénica al injerto si se introduce en la cavidad.

1.2.6.2. Desventajas

- Las mismas que en la técnica de ventana lateral.

1. 3. Supervivencia de implantes en seno

Se han publicado numerosos metaanálisis y revisiones sistemáticas que pueden ser consideradas como clásicos en la literatura científica. Todos ellos reportan tasas de supervivencia de implantes en seno injertado superiores al 90%: 90% (Jensen et al., 1998), 93% (Tong et al., 1998), 92,6% (Wallace and Froum, 2003), 91,49% (Del Fabbro et al., 2004), 90-93% (Pjetursson et al., 2008), 95,5% (Jensen and Terheyden, 2009). Aunque se debe considerar que la supervivencia aumenta en función de la altura de la cresta residual (Rios et al., 2009), es obvio que con alturas menores a 4mm, no hay más alternativa que la realización de una técnica de elevación de seno maxilar (Esposito et al., 2014). Es interesante en este sentido, diferenciar los resultados en función a cada uno de los parámetros de relevancia, como son la técnica, el

-

biomaterial y las características del injerto, tanto de los citados metaanálisis como de artículos originales:

- Hueso pristino vs. injertado: 90.3 vs. 97% (Olson et al., 2000).
- Ventana lateral en general: 97.3% (Fugazzotto and Vlassis, 1998); 91.8% (Wallace and Froum, 2003).
- 1 vs. 2 fases:: 95.9 vs. 96.8% (Pjetursson et al., 2008); 89.7 vs. 89.6% (Wallace and Froum, 2003).
- Injerto en bloque vs. particulado: 91 vs. 94% (Tolman, 1995); 83.3 vs. 92.3% (Wallace and Froum, 2003).
- Injertos:
 - o Autógeno solo: 84-97% (Del Fabbro et al., 2004); 94.2% (Jensen and Terheyden, 2009).
 - o Sustituto solo: 90-96% (Del Fabbro et al., 2004); 96.8% (Jensen and Terheyden, 2009).
 - o Xenoinjerto vs. xenoinjerto + autógeno: 92.2 vs. 77.2% (Hising et al., 2001); sin diferencias (Froum et al., 1998).
 - o Autógeno vs. 20-80 autógeno-xenoinjerto vs. xenoinjerto solo: 82.4 vs. 94.4 vs. 96% (Hallman, Sennerby, et al., 2002).
 - o Autógeno + xenoinjerto + PRP: 99% (Galindo-Moreno et al., 2007).
 - o Autógeno + xenoinjerto vs. autógeno + bioglass: 100% (Galindo-Moreno et al., 2008).
 - o Autógeno + xenoinjerto: 100% (Galindo-Moreno, Padial-Molina, et al., 2010; Galindo-Moreno, Moreno-Riestra, et al., 2010).

- Autógeno + xenoinjerto 20-80 vs. 50-50: 100% (Galindo-Moreno, Moreno-Riestra, et al., 2011).
- Membrana vs. no membrana: 99.2 vs. 96.3% (Froum et al., 1998); 100 vs. 92.6% (Tarnow et al., 2000); 93.1 vs. 78.1% (Tawil and Mawla, 2001); 93.6 vs. 88.7% (Wallace and Froum, 2003); 99.3 vs. 96% (Pjetursson et al., 2008); 100 vs. 94.7% (Jensen and Terheyden, 2009).

1. 4. Biomateriales para elevación de seno

Como se acaba de describir, al realizar una técnica de elevación de seno, el material a emplear es de extrema importancia, aunque algunos autores sugieren que no es especialmente relevante ya que se trata de una cavidad confinada rodeada de hueso y fuentes osteogénicas en todos sus lados, incluyendo la membrana de Schneider (Srouji et al., 2009). Sin embargo, las características del injerto van a determinar las características del hueso neoformado, lo cuál, sin duda, determinará el comportamiento posterior de los implantes colocados en la zona.

Un biomaterial ideal debería cumplir al menos las siguientes características (Boyne, 1973): 1) Disponibilidad ilimitada; 2) Promover la osteogénesis; 3) Facilitar la vascularización; 4) Proveer un armazón estructural que estimule la osteoconducción; 5) Adaptabilidad a una amplia variedad de requerimientos físicos; y 6) Ser reemplazado por tejido nuevo de similares o mejores características que el previo. Además, debería ser resistente a la infección, con buenas características de manejo y adecuados costes (Rosenberg and Rose, 1998; Buser, 2009). En este sentido, el hueso autógeno continúa siendo el material de referencia, o como se conoce en la literatura científica “gold standard”, para este tipo de procedimientos quirúrgicos. Su principal virtud es que aúna propiedades (osteogenicidad, osteoinductividad, osteoconductividad, osteotrofismo, y ausencia de respuesta inmune) que ningún otro material puede ofrecer, aproximándose más que cualquier otro a los criterios ideales propuestos por Boyne.

La neoformación y maduración ósea es un proceso coordinado que implica diversos factores. Uno de los primeros eventos que ha de ocurrir durante los procesos de cicatrización es la angiogénesis (Carter, 2000). Este proceso está regulado por un complejo sistema de

señalización bioquímica mediado por factores de crecimiento angiogénicos tales como bFGF o TGF- β (Einhorn et al., 1995).

Junto con las numerosas modificaciones técnicas de la elevación de seno maxilar, se han propuesto, además, numerosos tipos de materiales de relleno para la promoción de la regeneración ósea (Moy et al., 1993), tales como hueso autólogo, xenoinjertos, materiales aloplásticos, concentrados plaquetarios y/o de fibrina, o una combinación de ellos (Del Fabbro et al., 2004; Wallace and Froum, 2003; Wheeler, 1997) (Tabla 4).

Tabla 4: Propiedades de los diferentes tipos de injerto (Klokkevold and Jovanovic, 2002).

	Osteoconductor	Osteoinductor	Osteogénico	Definición
Aloplástico	+	-	-	Material inerte o sintético
Xenoinjerto	+	-	-	Material de otra especie animal
Aloinjerto	+	+/-	-	Material de la misma especie
Autoinjerto	+	+	+	Material del propio paciente
Definición	El material sirve de andamiaje para el crecimiento de	El material promueve la diferenciación de células	El material contiene células vivas con capacidad de	

Los últimos análisis sistemáticos de la literatura a este respecto no han podido concluir ninguna superioridad de un injerto óseo en particular en términos de supervivencia del implante o ausencia de complicaciones en la zona receptora del injerto (Browaeys et al., 2007; Nkenke and Stelzle, 2009). Es así que muchos clínicos aceptan como consenso general que la

elevación de suelo de seno es una técnica predecible sin importar el material que se utilice, con tasas de supervivencia de los implantes de entre el 61% y el 100% (Wallace and Froum, 2003). Este éxito no solo está condicionado por la técnica quirúrgica empleada, sino que gran parte del mismo depende del tipo y estructura del biomaterial empleado (McAllister and Haghighat, 2007). Además, es importante tener en cuenta que los resultados a largo plazo no sólo dependen de la falta de complicaciones aparentes si no que también vienen determinados por la formación de un tejido óseo vital y funcional (Watzek et al., 2006). En todo caso, independientemente de la tasa de éxito clínico implantológico, es imprescindible conseguir primariamente la integración del injerto en el contexto de la zona injertada. Sin este prerrequisito, obviamente, no será posible el éxito final de la técnica.

El hueso autólogo es una fuente rica en factores de crecimiento osteogénicos como BMP y factores de crecimiento angiogénicos, como bFGF y TGF β , entre otros (Radomsky et al., 1998), que van a jugar un papel muy importante en la angiogénesis (Lakey et al., 2000). En éste sentido, cabe mencionar que las partículas de tamaño pequeño ($< 8\text{mm}^3$) fomentan una mayor actividad osteoclástica (Merkx et al., 2003). Esto permitirá una reabsorción mucho más rápida y completa que los fragmentos de mayor tamaño (Fonseca et al., 1980). Distintos autores, en este sentido, han demostrado mejores tasas de supervivencia en implantes colocados en senos injertados con hueso particulado frente a aquellos injertados con hueso en bloque (Wallace and Froum, 2003).

Los motivos que condicionan esto pueden ser varios. Por una parte, puede esgrimirse una mayor dificultad de revascularización, por falta de penetración de las yemas vasculares, en la mayoría de los casos atribuible a la dificultad de fijación de los injertos, lo que conlleva movilidad de los mismos, y por tanto, dificultad para revascularizarlos. También puede deberse a la dificultad de reabsorción de estos grandes bloques de tejido óseo injertado, motivo por el cuál los injertos en bloque para técnicas intrasinusales no son recomendables. Además, requieren de una segunda zona donante, con el consiguiente aumento de la morbilidad, y según las zonas donantes, la reabsorción del injerto puede ser excesiva, pudiendo llegar incluso a ser hasta del 60% en épocas tempranas (McAllister et al., 1999). Esta reabsorción excesiva puede comprometer la viabilidad de la técnica implantológica.

-

Por tanto, pese a que su validez clínica y la regeneración ósea que promueve dadas sus características osteoconductoras, osteoinductoras y osteogénicas, además de que aporta importantes factores angiogénicos y osteogénicos están fuera de toda duda, la utilización de hueso autólogo plantea diversos inconvenientes. Entre los más destacables son la obtención del injerto, ya que normalmente requiere de la apertura de un segundo campo quirúrgico. Además, por éste preciso motivo, la disponibilidad del mismo es limitada (McAllister and Haghghat, 2007; Misch, 1997). Más aún, sufre una excesiva remodelación y reabsorción cuando se emplea como único componente del injerto. Estas tasas de reabsorción suponen un 3.8% de pérdida de volumen en los tres primeros meses hasta un 39.8% a los 180 días en senos injertados y estabilizados con la colocación de implantes en una sola fase quirúrgica (Schlegel et al., 2003). El grado de reabsorción se ve determinado tanto por el origen embriológico del tejido (el hueso membranoso es reabsorbido en menor proporción que el hueso de origen endocondral) (Thorwarth et al., 2005), así como por la presentación del mismo, ya que un injerto en bloque se reabsorbe en menor medida que un injerto particulado (Lorenzetti et al., 1998). Además, es bien sabido que materiales aloplásticos, como la hidroxiapatita o el fosfato tricálcico, así como algunos injertos de origen animal, presentan una tasa de reabsorción mucho más lenta comparados con el hueso autólogo, pudiendo perdurar en condiciones de biocompatibilidad incluso por años (Iezzi et al., 2008; Traini et al., 2007).

Así, si tenemos en cuenta que el mantenimiento de un espacio y una estabilidad estructural del injerto que permitan la maduración ósea es uno de los principios fundamentales a respetar cuando se pretende conseguir un aumento óseo, la aplicación de un injerto mixto compuesto en parte por hueso autólogo y hueso de origen exógeno con estabilidad estructural que actúe a manera de andamiaje, previniendo el colapso del injerto están plenamente justificadas y parece claramente razonable. Se podría conseguir con ello un efecto aditivo de las propiedades favorables de estos materiales, combinando el potencial biológico del hueso autólogo con la capacidad de mantener un andamiaje osteoconductor por parte del sustituto óseo. Además, las combinaciones propuestas en la literatura aportan adecuados porcentajes de los compartimentos tisulares “tejido mineralizado” y “tejido no mineralizado”, de especial relevancia en la remodelación del injerto y, por tanto, la supervivencia a largo plazo de los implantes colocados en la zona injertada (Tabla 5).

Tabla 5: Proporciones de los diferentes compartimentos tisulares óseos en función al tipo de injerto.

Injerto	Tejido mineralizado (%)	Tejido no mineralizado (%)	Referencia
Aloinjerto	28.25	64.1	(Froum et al., 2006)
Xenoinjerto	12.44	54.56	
	37.7 ± 31.3	-	(Hallman, Sennerby, et al., 2002)
Autógeno + xenoinjerto (20-80)	39.9 ± 8	-	
Autógeno + xenoinjerto (20-80)	37 ± 17.46	31.92 ± 16.05	(Galindo-Moreno, Moreno-Riestra, et al., 2011)
Autógeno + xenoinjerto (50-50)	36 ± 9.44	44.8 ± 13.51	
Autógeno + bioglass	33.08 ± 8.18	53.35 ± 4.24	(Galindo-Moreno et al., 2008)
Autógeno + xenoinjerto + PRP	34 ± 6.34	49.6 ± 6.04	(Galindo-Moreno et al., 2007)
Autógeno	41.7 ± 26.6	-	(Hallman, Hedin, et al., 2002)
Aloinjerto	23.4	53.9	(Avila et al., 2010)

1. 5. Combinación de hueso autógeno y hueso bovino anorgánico

De todas las estrategias estudiadas en la literatura, la combinación de hueso autógeno con materiales de reabsorción más lenta como el hueso bovino anorgánico es una de las exitosas (Hallman, Sennerby, et al., 2002; Yildirim et al., 2001). Este xenoinjerto puede permanecer sin reabsorber durante años (Ferreira et al., 2009; Sartori et al., 2003; Traini et al., 2007). Aunque esto pueda parecer una desventaja, se ha demostrado que puede ser sometido a revascularización y además presenta una muy buena osteoconductividad (Galindo-Moreno, Padial-Molina, et al., 2010). Es un biomaterial biocompatible que presenta una estructura y propiedades físicas similares a las del hueso humano. Cuando se emplea en combinación con éste, proporciona mantenimiento del espacio y enlentecimiento del proceso resorptivo mientras que el hueso autógeno, si se obtiene en el mismo momento de la cirugía, aporta celularidad y factores de crecimiento (Wallace and Froum, 2003; Schlegel et al., 2003). Un inconveniente del uso de hueso autólogo es la necesidad de realizar un segundo campo quirúrgico para la obtención del injerto. No obstante, éste inconveniente se puede solucionar mediante el uso de la técnica modificada de rascador (Martos Diaz et al., 2007; Galindo-Moreno et al., 2007). Mediante esta técnica, la ventana ósea de acceso al seno maxilar es recolectada con lo que puede ser reutilizada como componente del injerto en lugar de ser descartada.

Aunque el uso de la combinación de hueso autólogo y xenoinjerto de origen bovino ha sido propuesta en la literatura (Hallman, Sennerby, et al., 2002; Galindo-Moreno et al., 2007; Wallace and Froum, 2003), los tejidos analizados presentan importantes diferencias dependiendo de la naturaleza del injerto, la proporción de materiales utilizados y el tiempo transcurrido desde el injerto. Más aún, la maduración, consolidación y estabilidad del injerto dependen altamente de la formación de un complejo hueso-injerto funcional (Busenlechner et al., 2009). En este proceso, una amplia variedad de factores dependientes del paciente pueden influenciar los resultados finales (Avila et al., 2010). A día de hoy conocemos de la asociación entre el consumo de tabaco y alcohol y la historia de enfermedad periodontal con menores tasas de éxito de los implantes dentales (Levin et al., 2004; Levin et al., 2011; Levin and Schwartz-Arad, 2005; Anner et al., 2010; Kan et al., 2002).

Por tanto, si bien el conocimiento en este campo es abundante y creciente, aún existen importantes cuestiones sin resolver en cuanto a los factores que influyen en la consolidación del material de injerto y respecto al uso de injertos combinados en elevación de suelo de seno maxilar, motivo por el cual se planteó la realización de la presente Tesis Doctoral.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

El presente trabajo de investigación conducente a la obtención del Título de Doctor tuvo por objetivos principales los siguientes:

- **Objetivo 1:** Analizar morfológica e histomorfológicamente las diferencias entre hueso nativo posterior maxilar y el obtenido 6 meses tras la realización de técnicas de elevación de suelo de seno maxilar empleando un injerto compuesto de hueso bovino anorgánico y hueso autólogo obtenido mediante rascador.
- **Objetivo 2:** Comparar los resultados histológicos obtenidos con el uso de dos combinaciones de injerto con diferentes proporciones de xeno y autoinjerto.
- **Objetivo 3:** Evaluar la influencia de un grupo de variables dependientes del paciente en los resultados histológicos, histomorfométricos y radiológicos tras la elevación del suelo del seno maxilar.

***APORTACIONES
DEL DOCTORANDO***

APORTACIONES DEL DOCTORANDO

Las tareas principales del doctorando en el estudio objeto de esta tesis doctoral han sido las siguientes:

- Colaboración en el diseño del estudio.
- Selección de pacientes y realización de las intervenciones quirúrgicas de elevación de suelo de seno maxilar en uno de los centros participantes.
- Obtención de muestras de tejido óseo de la zona regenerada.
- Colaboración en el análisis de las imágenes histológicas y radiográficas obtenidas.
- Colaboración en la redacción de los manuscritos posteriormente publicados.
- Redacción de la presente memoria y compilación de publicaciones previas.

METODOLOGÍA

METODOLOGÍA

1. 1. Diseño del estudio

Todos los procedimientos fueron realizados tras la aprobación por parte del Comité de Ética en Investigación Humana de la Universidad de Granada y tras la obtención del correspondiente consentimiento informado por cada paciente. El estudio se realizó de acuerdo con los principios de la declaración Helsinki (Schuklenk and Ashcroft, 2000).

El diseño principal del estudio consistió en un ensayo clínico multicéntrico, prospectivo controlado.

Para los diferentes análisis se emplearon distintas poblaciones, como podrá verse en detalle en cada una de las publicaciones del Apéndice, si bien los criterios de inclusión y exclusión fueron los mismos para todos los pacientes del estudio. Como resumen, se incluyeron pacientes que cumplieran los siguientes criterios de inclusión:

- Edad entre 18 y 85 años,
- con necesidad de realización de elevación de suelo de seno maxilar en 2 fases, es decir, con menos de 5 mm de cresta alveolar remanente (Zinner and Small, 1996; Wang and Katranji, 2008),
- para la posterior colocación de implantes dentales por ausencias dentales múltiples o unitarias,
- con estado físico general ASA I o II,
- ausencia de enfermedad sistémica no controlada o cualquier condición conocida que altere el metabolismo óseo (osteoporosis, diabetes mellitus, etc.)
y
- adecuada higiene oral (índice de placa de O'Leary $\leq 20\%$) (O'Leary et al., 1972).

Los pacientes fueron excluidos si:

-

- Habían tomado antibióticos en los 3 meses anteriores,
- habían tomado de forma prolongada (>6 meses) medicación que modifique el metabolismo óseo (como bifosfonatos, corticosteroides, etc.),
- mujeres embarazadas o con la intención de quedarse durante el tiempo del estudio,
- pacientes que presentasen cualquier enfermedad aguda o crónica del seno maxilar (sarcoïdosis, osteomas, carcinomas, etc.),
- sepsis,
- historia de cáncer y/o radioterapia en la cavidad oral en los últimos 18 meses,
- quimioterapia en los últimos 12 meses,
- o complicaciones derivadas de éstas condiciones y
- pacientes fumadores de más de 10 cigarrillos al día (Levin et al., 2004) o
- consumidores de más de 10 gramos de alcohol por día (Galindo-Moreno et al., 2005).

1. 2. Procedimientos quirúrgicos

A todos los pacientes les fue prescrita una pauta antibiótica consistente en 875 mg de amoxicilina y 125 mg de ácido clavulánico cada 8 horas durante 7 días comenzando el día anterior a la cirugía. Los pacientes alérgicos a penicilinas recibieron 300 mg de clindamicina.

Todos los procedimientos fueron realizados bajo anestesia local (articaina, Ultracain[®], Aventis Inc., Frankfurt, Alemania). La técnica quirúrgica consistió en una modificación de la técnica convencional de ventana lateral en la que el acceso al interior de la cavidad ósea sinusal se consigue mediante el uso de un rascador de hueso (Safe scraper[®], Meta corp., Remigia, Italia) (Galindo-Moreno et al., 2007; Martos Diaz et al., 2007). Mediante esta técnica es posible recolectar el hueso cortical de la pared lateral del seno maxilar hasta exponer la membrana de

Schneider. A continuación, con el correspondiente instrumental específico, se procede al despegamiento de la membrana a nivel del suelo del seno, paredes medial, anterior y posterior alrededor de la zona donde se procederá a la colocación de implantes. Tras la elevación de la membrana, se procedió a la colocación del injerto en el interior de la cavidad. El injerto consistió en una mezcla 50-50% o 20-80% del hueso autógeno obtenido mediante el rascador con hueso bovino anorgánico (Bio-Oss[®], tamaño de partícula 250–1000 µm, Geistlich Pharma AG, Wolhusen, Suiza). Estas proporciones de injerto habían sido previamente descritas como ideales para la elevación de seno maxilar (Hallman, Sennerby, et al., 2002). El volumen de injerto varió entre 3 y 5 cc, volumen necesario para la consecución del objetivo clínico. Tras la colocación del injerto, se colocó una membrana reabsorbible de colágeno (Bio-Gide[®] – Geistlich Pharma AG) para cubrir la zona y evitar la invasión del injerto por tejido blando. Para la sutura de los colgajos se empleó sutura de seda de 3-0 (Laboratorio Aragón, Barcelona, España). Se prescribió medicación anti-inflamatoria (ibuprofeno 600 mg a demanda con un máximo de 3600 mg por día). La sutura fue retirada a las 2 semanas.

Tras un período de curación de 6 meses, se empleó una trefina de 3 mm de diámetro interno y 4 mm de diámetro externo para la obtención de muestras de hueso de la zona previamente injertada en la misma zona donde se procedería a continuación a la colocación de los implantes dentales correspondientes. Para éste estudio se emplearon dos tipos de implantes diferenciados: Astra Tech (Osseospeed[™], Astra Tech, Mölndal, Suecia) o Microdent[®] (Microdent Implant System, Barcelona, España). Finalmente, tras otros 6 meses de período de osteointegración, se procedió a la colocación de los correspondientes pilares de cicatrización transepitelial para la posterior toma de impresiones, fabricación y colocación de las correspondientes prótesis dentales fijas atornilladas implanto-soportadas. Todos los pacientes fueron después incluidos en el protocolo estándar de seguimiento cada 3 meses.

Se emplearon además un total de 10 pacientes (5 hombres y 5 mujeres) como control de hueso maxilar posterior. Estos pacientes necesitaban colocación de implantes en sectores posteriores maxilares pero no habían sido sometidos a elevación de seno. La obtención de la muestra no interfiere con la colocación normal de implantes al ser necesaria la creación de un lecho para su colocación en cualquier caso.

-

1. 3. Datos Demográficos y de Hábitos

Para todos los pacientes se recogieron los siguientes datos:

- Edad.
- Género.
- Número de implantes por paciente.
- Tipo de edentulismo: parcial (al menos una ausencia en maxilar posterior) o total (ningún diente remanente en la arcada superior).
- Hábitos de consumo de alcohol (Galindo-Moreno et al., 2005).
- Hábitos tabáquicos (Wallace, 2000): No fumador = 0 cigarrillos por día; Fumador moderado = ≤ 10 cigarrillos por día; Muy fumador = > 10 cigarrillos por día.
- Historia de enfermedad periodontal en edéntulos totales. Los edéntulos parciales fueron clasificados en el grupo de enfermedad periodontal si presentaron pérdida de inserción clínica de más de 3 mm en al menos 3 dientes no adyacentes (Tonetti et al., 2005). Para éstas medidas se empleó una sonda tipo Michigan (Hu-Friedy, Chicago, Illinois, EEUU).

1. 4. Estudio radiográfico

Se obtuvieron radiografías panorámicas estandarizadas (Kodak ACR-2000, Eastman Kodak Company, Rochester, Nueva York, EEUU) de todos los pacientes en el momento de la evaluación inicial, tras la elevación de seno, a los 6 meses, en el momento de la colocación de la restauración final y a los 24 meses. Las medidas lineales se realizaron mediante el software especializado Dent-A-View v1.0 (DigiDent, DIT, Nesher, Israel). Dichas medidas fueron realizadas por al menos 2 examinadores previamente calibrados. Se midió la altura alveolar remanente previa a la elevación de seno y la altura final en los diferentes tiempos tras la colocación del injerto intrasinal.

1. 5. Estudio histológico

Las muestras de hueso fueron, en primer lugar, fijadas en formalina tamponada al 10% durante 24 horas. A continuación fueron decalcificadas en una solución decalcificante conteniendo formaldehído (10%), ácido fórmico (8%) y metanol (1%) (Decalcifier I, Surgipath® Europe Ltd., Peterborough, Reino Unido) durante al menos 20 días. Finalmente fueron embebidas en parafina y seccionadas longitudinalmente siguiendo el eje central en espesores de 4 μm . Éstas secciones fueron limpiadas de parafina, rehidratadas y teñidas mediante diferentes técnicas: hematoxilina-eosina, técnica de Schiff, tricrómico de Masson y tricrómico de Goldner.

Para el análisis histomorfométrico se obtuvieron imágenes de las secciones teñidas mediante tricrómico de Masson y fueron evaluadas mediante un método semiautomático. En resumen, se obtuvieron 10 imágenes randomizadas por muestra mediante un microscopio equipado con un objetivo 10X y una cámara digital (DP70, Olympus Optical Company Ltd., Tokyo, Japón) y se evaluaron mediante el software especializado Image J (NIH, EEUU, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Se calcularon los porcentajes de tejido mineralizado, tejido no mineralizado y partículas remanentes. Además, se contabilizaron las líneas de tejido osteoide.

1. 6. Estudio Inmunohistoquímico

Secciones adicionales fueron igualmente limpiadas de parafina y rehidratadas y, posteriormente, tratadas mediante EDTA 1mM a 95°C durante 20 minutos en un módulo de pretratamiento (Thermo Fisher Scientific, Fremont, California, EEUU) con objeto de exponer los antígenos. A continuación, las secciones se incubaron durante 60 minutos a temperatura ambiente con los diferentes anticuerpos para la detección de osteopontina y BMP-4 (para la detección celular e intersticial), CD56 [Clone 56C04/123A8] (para la identificación de osteoblastos), TRAP-1 [Clone 26E5] (para identificar osteoclastos), CD68 [Clone KP1] (para identificar monocitos/macrófagos) y vimentina [Clone V9] (para identificar células mesenquimales, Control positivo). Todos los anticuerpos fueron obtenidos de la misma compañía (Master Diagnóstica, Granada, España). La detección de la reacción inmunohistoquímica fue realizada en un inmunoteñidor automático (Autostainer 480, Thermo

-

Fisher Scientific) usando el método polímero-peroxidasa seguido de visualización por diaminobenzidina (Master Diagnóstica).

El número de células positivas por mm^2 se calculó mediante imágenes capturadas en microscopio (BH2, Olympus Optical Company Ltd., Tokyo, Japón) con objetivo 40X con escala milimétrica.

1. 7. Estudio de Microscopía Electrónica

Varios fragmentos de 1 mm^2 obtenidos a diferentes niveles en cada muestra (coronal, medial y apical), incluyendo hueso trabecular y cortical, se fijaron en glutaraldehído al 2,5% durante 24 horas para su posterior decalcificación según el método descrito anteriormente. A continuación se realizó un postfijado en 1% OsO_4 a 4°C durante 2 horas, lavado en agua destilada, deshidratación en acetona y embebida en Epon. Se obtuvieron después secciones semifinas que se tiñeron con azul de toluidina. Finalmente se obtuvieron también secciones ultrafinas ($\approx 70 \text{ nm}$) mediante un ultramicrotomo (Reichert-Jung Ultracut E, Leica Microsystems, Barcelona, España) que se tiñeron con citrato de plomo y acetato de uranilo para su visualización mediante microscopio electrónico de transmisión (Zeiss EM 902, Barcelona, España). Las imágenes fueron procesadas mediante el software analySIS[®] para Windows (Soft Imaging System, Múnster, Alemania).

1. 8. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico, cualquier paciente que fumase al menos un cigarrillo o tomase al menos una bebida alcohólica al día fue considerado fumador o bebedor, respectivamente.

Para los diferentes análisis dependiendo del objetivo concreto de cada subestudio se emplearon las metodologías estadísticas más apropiadas en cada caso, como el t test de Welch, correlaciones de Pearson, chi-cuadrado o U de Mann-Whitney. Además, para el análisis de los factores predictores se realizaron sendos análisis de regresión múltiple para estudiar los hallazgos radiográficos en función al porcentaje de partículas remanentes como variable dependiente y todas las demás como predictores (edad, sexo, tipo de edentulismo, número de implantes, consumo de alcohol y tabaco, historia de enfermedad periodontal, porcentaje de

tejido no mineralizado y número de líneas osteoides). El mismo análisis se volvió a realizar pero esta vez estudiando los hallazgos histológicos e histomorfométricos. En todos los casos, se consideró la significación estadística para valores $p < 0,05$.

***RESULTADOS
PRINCIPALES***

RESULTADOS PRINCIPALES

Los diferentes estudios publicados y que se adjuntan como anexos se pueden resumir en los siguientes resultados principales:

1) Resultados radiográficos:

- a) A menor proporción de partículas remanentes de hueso bovino anorgánico en la muestra obtenida a 6 meses, mayor reabsorción ósea a nivel radiográfico (Galindo-Moreno, Moreno-Riestra, et al., 2010).
- b) A mayor proporción de tejido no mineralizado en la muestra obtenida a 6 meses, mayor reabsorción ósea a nivel radiográfico (Galindo-Moreno, Moreno-Riestra, et al., 2010).
- c) A mayor porcentaje de hueso bovino anorgánico en la mezcla del injerto, mayor reabsorción ósea a nivel radiográfico (Galindo-Moreno, Moreno-Riestra, et al., 2011).
- d) Mayor reabsorción ósea a nivel radiográfico en pacientes con historia de enfermedad periodontal y en pacientes edéntulos (Galindo-Moreno, Moreno-Riestra, et al., 2012).
- e) El análisis de regresión múltiple sólo muestra relación del porcentaje de partículas remanentes de hueso bovino anorgánico con la reabsorción ósea a nivel radiográfico (Galindo-Moreno, Moreno-Riestra, et al., 2012).

2) Resultados morfológicos e histomorfométricos:

- a) En el hueso nativo predomina el componente medular con abundante número de adipocitos, similar proporción de tejido mineralizado y no mineralizado y similar abundancia de osteoblastos y osteoclastos, aunque mayor de osteocitos, así como menor número de líneas osteoides (Galindo-Moreno, Moreno-Riestra, et al., 2010).
- b) El hueso trabecular nuevo se encuentra en íntimo contacto con las partículas remanentes de hueso anorgánico con abundante presencia de líneas de cementación (Galindo-Moreno, Moreno-Riestra, et al., 2010).

- c) Existe una mayor cantidad de líneas osteoides cuanto mayor es la proporción de hueso bovino anorgánico remanente (Galindo-Moreno, Moreno-Riestra, et al., 2010).
- d) Las diferentes proporciones de componentes del injerto no influyen en las proporciones de tejido mineralizado neoformado ni en el tejido no mineralizado si bien el número de líneas osteoides es más abundante en el grupo 50-50%, que además mostró mayor presencia de los diferentes tipos celulares analizados (Galindo-Moreno, Moreno-Riestra, et al., 2011).
- e) Los pacientes edéntulos totales presentaron mayor porcentaje de tejido mineralizado neoformado y de tejido no mineralizado y menor proporción de partículas remanentes de hueso bovino anorgánico (Galindo-Moreno, Moreno-Riestra, et al., 2012).
- f) A mayor edad, menor número de osteoblastos por mm^2 (Galindo-Moreno, Moreno-Riestra, et al., 2012).
- g) Pacientes con historia de periodontitis presentaron mayor número de osteoblastos por mm^2 , mayor cantidad de tejido no mineralizado, menor porcentaje de partículas remanentes de hueso bovino anorgánico y menor número de líneas osteoides. De hecho, la historia de enfermedad periodontal fue la única variables capaz de influir significativamente en el modelo de regresión múltiple considerando las partículas remanentes como variable dependiente y todas las demás como predictores (Galindo-Moreno, Moreno-Riestra, et al., 2012).
- h) El consumo de tabaco se correlacionó con la historia de enfermedad periodontal, número de osteoblastos por mm^2 y porcentaje de tejido no mineralizado (Galindo-Moreno, Moreno-Riestra, et al., 2012).

3) Resultados inmunohistoquímicos:

- a) Aunque existen diferencias en la expresión de los marcadores inmunohistoquímicos empleados en este estudio, los diferentes porcentajes de hueso autógeno y de hueso bovino anorgánico en el injerto no influyen de forma estadísticamente significativa en

la expresión de CD56, TRAP-1, CD68 y BMP-4 (Galindo-Moreno, Moreno-Riestra, et al., 2011).

- b) La expresión de osteopontina en el tejido mineralizado neoformado y las líneas de cementación entre éste y las partículas de hueso bovino anorgánico fue significativamente mayor en el grupo con menor proporción de hueso bovino anorgánico (Galindo-Moreno, Moreno-Riestra, et al., 2011).

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

A modo de resumen, considerando que una discusión más detallada puede encontrarse en los anexos que incluyen los artículos publicados como resultado de los trabajos de esta tesis, es importante mencionar aquí algunos aspectos clave de los encontrados durante la realización de esta investigación, algunos de cuáles continúan siendo de actualidad desde la publicación de los trabajos.

La elevación de suelo de seno maxilar tiene por objeto la creación de un nuevo espacio ocupado por tejido óseo vital capaz de adaptarse biológicamente a los requerimientos derivados del soporte de prótesis dentarias implantosoportadas. Así, se ha propuesto que, como mínimo, el hueso resultante de la colocación de injertos óseos en la zona debe conseguir proporciones de tejido mineralizado similares a aquellas del hueso nativo. Estudios previos han descrito dichas proporciones como un rango del 23-28%, dependiendo de otras variables como la edad y el género (Trisi and Rao, 1999; Ulm et al., 1999). En nuestro estudio hemos encontrado proporciones superiores ($45.73 \pm 7.98\%$), posiblemente debido a las características propias de la población analizada, ya que éstas proporciones se ven influenciadas por la altura de cresta remanente (Monje et al., 2015).

Con respecto a las proporciones de los distintos compartimentos tisulares del hueso tras la regeneración, los resultados del presente estudio son los más elevados reportados en la literatura en cuanto a la proporción de nuevo hueso mineralizado (46.08%), seguido de otras series como la publicadas por Cordaro (45.2%) (Cordaro et al., 2008) y Artzi (41.6% tras 9 meses) (Artzi et al., 2008). Esta observación puede explicar en parte la mayor tasa de supervivencia reportadas en maxilar posterior tras injerto (Olson et al., 2000; Scarano et al., 2006).

En estas ventajas juega un papel fundamental el tipo de injerto concreto que se utilice. En nuestras series empleamos una técnica modificada de acceso lateral a la cavidad sinusal mediante la cual dicho acceso se crea empleando un rascador óseo que es capaz de recolectar todo el hueso de la zona y que, posteriormente, podrá ser utilizado como componente del injerto de forma aislada o en combinación con cualquier otro biomaterial comercial (Galindo-

Moreno et al., 2007; Martos Diaz et al., 2007). Con esta técnica se evita la necesidad de abordar segundos campos quirúrgicos. Este instrumento, además de almacenar el hueso cortical del paciente, junto con sangre del mismo, tiene la virtud de no dañar los tejidos blandos, aún en contacto con ellos, lo que evita accidentes o complicaciones inherentes a la técnica como es la perforación de la membrana sinusal.

El hueso autógeno es aún considerado el “gold standard” en regeneración ósea. Se trata de un material de injerto fácilmente reabsorbible y modelable por la acción de osteoclastos. Esto facilita los procesos de remodelación de la masa mineral (bone turnover) y una maduración adecuada del tejido. Por este motivo, se ha indicado que no es posible encontrar hueso autógeno original injertado en muestras tomadas 5 meses después de la colocación del injerto, siendo todo el hueso presente, hueso neoformado, joven, vital y trabeculado (de Lange and Tadjoedin, 2002). Sin embargo, ésta rápida reabsorción puede suponer también una importante desventaja en cuanto a la pérdida de volumen, que puede ser incluso del 60% (Jensen and Sindet-Pedersen, 1991). Por tanto, la combinación con otros biomateriales parece indicada. El uso de hueso de origen xenógeno ha sido ampliamente estudiado en la literatura. Entre sus principales ventajas destaca su baja tasa de reabsorción (Piattelli et al., 1999; Taylor et al., 2002), estando presente incluso tras 9 años (Traini et al., 2007) y 10 años (Pardinas Lopez et al., 2015). Además, es un material química y físicamente idéntico la hidroxiapatita humana (Smiler et al., 1992). Su estructura porosa sirve para incrementar el área de superficie del biomaterial. Esto lo hace un perfecto andamiaje para la regeneración ósea y un adecuado substrato para la neoangiogénesis.

En el presente estudio, el mantenimiento tras 6 meses de amplias proporciones de partículas remanentes soporta el mantenimiento global del volumen injertado, como puede derivarse de las reducidas tasas de pérdidas óseas verticales observables en radiografía. Más aún, el mantenimiento de este tejido mineralizado incrementa significativamente el número de líneas osteoides, representativas de actividad mineralizadora empleando la partícula remanente como “apoyo” sobre el que continuar el proceso. Estas propiedades han sido confirmadas por estudios más recientes (Iezzi et al., 2012). Esto es, el hueso bovino anorgánico se comporta como un material osteoconductor ideal (Hallman, Sennerby, et al., 2002) con

excelentes propiedades estructurales (Schlegel et al., 2003) y respuesta clínica positiva a largo plazo (Mayfield et al., 2001). Esto se une a los hallazgos ultraestructurales de líneas de cementación y recanalización de las partículas por medio de osteoclastos (Galindo-Moreno et al., 2013), que no han sido observadas en otros biomateriales con altas tasas de reabsorción y disolución (Wiltfang et al., 2003; Zerbo et al., 2004; Annibali et al., 2015).

No obstante, el uso exclusivo de hueso bovino anorgánico presenta también sus inconvenientes. El material no es capaz de interactuar con el implante (Rosenlicht and Tarnow, 1999; Valentini et al., 1998), con lo que en principio podría no ser adecuado para zonas injertadas (Haas et al., 1998), ya que, de hecho, el contacto hueso-implante es significativamente menor cuando se utiliza de forma aislada (Jensen et al., 2013), y, además, si se emplea solo, es lento en cuanto a la inducción de la formación de hueso (Smiler et al., 1992). Así, se ha propuesto como una ventaja específica el uso combinado con hueso autógeno para mejorar la cantidad final de tejido óseo vital, para reducir el tiempo de curación (Tadjoedin et al., 2003; Thorwarth et al., 2006; Hallman, Hedin, et al., 2002) y para aumentar el contacto hueso-implante (Jensen et al., 2013). El presente estudio se propuso para evaluar diferentes proporciones de ambos injertos (50:50 vs. 20:80). Como se ha expuesto, los porcentajes de hueso vital obtenidos fueron mejores cuando el injerto contenía mayor proporción de hueso bovino anorgánico, como también se ha reportado previamente (Hallman, Hedin, et al., 2002). Se ha explicado este efecto como una consecuencia directa de la osteoconductividad del material (Tadjoedin et al., 2003). Sin embargo, se observaron un mayor número de líneas osteoides y mayor celularidad cuando la proporción de hueso autógeno fue mayor. Este hallazgo sugiere un mayor metabolismo en injertos con mayor proporción de hueso vital inicial (Smiler et al., 1992), debido a que el injerto autógeno proporciona células vivas y proteínas de matriz con propiedades osteoinductivas (Thorwarth et al., 2006). Estas observaciones han sido corroboradas por una menor actividad celular osteogénica in vitro en cultivos expuestos a hueso bovino anorgánico (de Melo et al., 2014). Estudios similares, aunque usando proporciones de 60:40 y 90:10 (Mordenfeld et al., 2014) (hueso bovino anorgánico y hueso autógeno, respectivamente) o de 50:50 y 100% de hueso bovino anorgánico (Schmitt et al., 2015), no han encontrado diferencias entre ambas mezclas de biomaterial ni en el estudio histomorfométrico ni radiográfico. Un reciente metaanálisis tampoco ha encontrado

-

diferencias respecto al uso de membranas, tipo de biomaterial ni tiempo de curación (Suárez-López Del Amo et al., 2015).

Otro hallazgo importante fue el de la distribución de marcadores específicos, en concreto, de osteopontina (OPN) y TRAP-1. La diferencia observada en función a la proporción de la mezcla de injerto sugiere que la proporción de hueso bovino anorgánico influye directamente en la reabsorción neta del injerto. Así, aunque se ha sugerido que el hueso bovino anorgánico no se reabsorbe (Mordenfeld et al., 2010), hemos confirmado por la expresión de TRAP-1 lo que otros autores habían también sugerido (Perrotti et al., 2009) respecto a la actividad osteoclástica en el procesamiento de éste biomaterial (Galindo-Moreno et al., 2013). Ha sido también concluido que partículas de tamaño pequeño, como las empleadas en el presente trabajo, se reabsorben de manera más rápida y generan mayor número de líneas osteoides (Klueppel et al., 2013). Dichos fenómenos de reabsorción del hueso bovino anorgánico promoverían, además, la liberación de iones Ca^{++} al medio, que inducirían un doble fenómeno. Por un lado el aumento de la concentración de Ca^{++} inhibiría por feed-back negativo la reabsorción mediada por osteoclastos (Traini et al., 2007) y promovería la maduración y diferenciación de células osteoprogenitoras de los tejidos circundantes. De éste modo, se facilitaría el depósito alrededor del hueso bovino anorgánico de un tejido neoformado de alto contenido osteocítico. Dicho tejido neoformado permitiría una organización ósea adaptativa que compensaría la ausencia de sincitio funcional dentro de las partículas de injerto xenógeno contribuyendo así al mantenimiento estructural de todo el injerto (Qiu et al., 2005). De éste modo, la presencia de osteocitos es un factor determinante que colaboraría a mantener la integridad injerto-hueso durante los procesos de remodelación ósea frente a estímulos externos o adaptativos, como por ejemplo ocurre una vez que los implantes colocados en este material son cargados. Pero más aún, estudios recientes han confirmado la presencia de osteocitos nuevos dentro de la osteona de las partículas remanentes de hueso bovino anorgánico (Galindo-Moreno et al., 2014). Si de este modo el sincitio de las partículas de hueso bovino anorgánico pueden ser recolonizadas por osteocitos y revascularizadas, se podría hipotetizar que el injerto maduro podría ser capaz de modular las tensiones biomecánicas y la respuestas a las mismas mediante el establecimiento de una red osteocitaria dentro de la propia partícula. Por tanto, de ser así, la reabsorción del injerto podría dejar de ser una

propiedad ideal del biomaterial. Por el contrario, algunos autores han observado reacción a cuerpo extraño y no reabsorción osteoclástica (Vandeweghe et al., 2013).

Por último, éstos aspectos y los descritos más ampliamente en las respectivas discusiones de los artículos publicados, fueron correlacionados con las variables clínicas del paciente: edad, sexo, tipo de edentulismo, historia de periodontitis y consumo de alcohol y tabaco.

Así, observamos una reducción del número de osteoblastos por mm^2 con el aumento de la edad, observación similar a la realizada por Zhang, que además encontró diferencias específicas en la combinación edad-sexo de forma que la edad parece no jugar un papel relevante en la función de los osteoblastos en hombres pero sí en mujeres (Zhang et al., 2004). Este hallazgo contrasta con reportes más recientes (Knabe et al., 2008; Galindo-Moreno, Padial-Molina, et al., 2010).

Por otro lado, las muestras de pacientes fumadores presentaron una reabsorción aumentada, asociado además con menores porcentajes de hueso bovino anorgánico remanente. El tabaco afecta negativamente a la expresión de hormonas paratiroides y otras enzimas implicadas en la regulación de la homeostasis ósea (Ward and Klesges, 2001), además de disminuir la actividad de la fosfatasa alcalina (Katono et al., 2009; Ramp et al., 1991). Más aún, consumidores compulsivos y de mayor edad presentan una mayor remodelación ósea (Elgan et al., 2003), posiblemente debido a la inducción de la reabsorción mediada por nicotina y la expresión alterada de metaloproteinasas (Katono et al., 2009). Como consecuencia, el consumo de tabaco puede también influir en la mayor pérdida ósea marginal periimplantaria (Lindquist et al., 1997; DeLuca and Zarb, 2006) y la pérdida temprana del implante (Mesa et al., 2008; Nogueroles et al., 2006; De Bruyn and Collaert, 1994; Esposito et al., 1998).

Respecto al consumo de alcohol, éste ha sido asociado con efecto sinérgico negativo con el tabaco. En el presente estudio, similar a otros (Diez et al., 1997; Galindo-Moreno et al., 2005), se observó menor celularidad, menor número de líneas osteoides, menor proporción de tejido mineralizado y mayor reabsorción en consumidores de alcohol.

Un hallazgo también a remarcar fue la mayor reabsorción de partículas remanentes de hueso bovino anorgánico en pacientes totalmente edéntulos en comparación con los

parcialmente edéntulos. Esto puede deberse a que la presencia de dientes afecta a la densidad de las trabéculas óseas, al hecho de que las prótesis removibles, principalmente portadas por edéntulos completos, ejercen presiones superficiales continuas, y, finalmente, a que la mayoría de pacientes edéntulos completos perdieron sus dientes por razones periodontales, antecedente también asociado con mayores tasas de reabsorción (Bassi et al., 1999).

En nuestra población hubo una alta correlación entre el edentulismo completo y la historia de periodontitis. Así, la baja proporción de partículas remanentes en pacientes con historia de enfermedad periodontal pudo tener un efecto directo sobre la reabsorción del injerto al perderse la estabilidad estructural aportada por el xenoinjerto. Esta mayor reabsorción ha podido deberse a la mayor actividad inflamatoria y de actividad osteoclástica presente en este tipo de pacientes (Cullinan et al., 2001), debido a la predisposición genética (Kinane and Lappin, 2002). Además, esta mayor actividad inflamatoria se ve acompañada por mayor actividad osteoclástica mediada por hormonas y citoquinas, como la IL-1 (Loomer et al., 1995). Más importante aún es el hallazgo de Verdugo y colaboradores que reporta la colonización por bacterias periodontopatógenas de injertos en pacientes sometidos a procedimientos de elevación del suelo del seno maxilar (Verdugo et al., 2009). Por tanto, sería factible especular que dichas bacterias podrían estimular la producción de citoquinas in situ que conducirían a una mayor reabsorción del injerto. Además, pacientes con antecedentes de enfermedad periodontal mostraron menor remodelación ósea (menos líneas osteoides) y mayor porcentaje de tejido no mineralizado.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. El uso de un injerto compuesto para elevación de seno maxilar consistente en hueso bovino anorgánico y hueso autólogo es altamente satisfactorio desde un punto de vista clínico e histológico.

2. La proporción de hueso autólogo y bovino anorgánico influye en la remodelación ósea y el contenido celular de forma que a mayor proporción de hueso autólogo, mayor actividad celular.

3. Los resultados clínicos de la elevación de seno maxilar no se ven afectados negativamente por los factores dependientes del paciente como historia de periodontitis, tipo de edentulismo y consumo de alcohol o tabaco pero sí la permanencia de hueso bovino anorgánico, que además se correlaciona de forma inversa con la reabsorción vertical medida en radiografía.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson J (1994). *The cell*. New York: Garland Publishing Inc.

Amler MH (1969). The time sequence of tissue regeneration in human extraction wounds. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 27:309–18.

Anderson DJ, Picton DC (1958). Masticatory stresses in normal and modified occlusion. *J Dent Res* 37:312–7.

Anner R, Grossmann Y, Anner Y, Levin L (2010). Smoking, diabetes mellitus, periodontitis, and supportive periodontal treatment as factors associated with dental implant survival: a long-term retrospective evaluation of patients followed for up to 10 years. *Implant Dent* 19:57–64.

Annibaldi S, Iezzi G, Sfasciotti GL, Cristalli MP, Voza I, Mangano C, et al. (2015). Histological and histomorphometric human results of HA-Beta-TCP 30/70 compared to three different biomaterials in maxillary sinus augmentation at 6 months: A preliminary report. *BioMed Res Int*:156850.

Aparicio C, Ouazzani W, Garcia R, Arevalo X, Muela R, Fortes V (2006). A prospective clinical study on titanium implants in the zygomatic arch for prosthetic rehabilitation of the atrophic edentulous maxilla with a follow-up of 6 months to 5 years. *Clin Implant Dent Relat Res* 8:114–22.

Aparicio C, Perales P, Rangert B (2001). Tilted implants as an alternative to maxillary sinus grafting: a clinical, radiologic, and periosteal study. *Clin Implant Dent Relat Res* 3:39–49.

Applegate EJ (1995). *The Anatomy and Physiology*. Philadelphia: W.B. Saunders Company.

Arana GF, Sarnachiaro O (2005). Subantral recovery technique (T.R.O.A.S.). *Int J Oral Maxillofac Surg* 34:678–9.

Araujo MG, Linder E, Lindhe J (2011). Bio-Oss collagen in the buccal gap at immediate implants: a 6-month study in the dog. *Clin Oral Implants Res* 22:1–8.

Araujo MG, Lindhe J (2005). Dimensional ridge alterations following tooth extraction. An experimental study in the dog. *J Clin Periodontol* 32:212–8.

Araujo MG, Lindhe J (2011). Socket grafting with the use of autologous bone: an experimental study in the dog. *Clin Oral Implants Res* 22:9–13.

Artzi Z, Weinreb M, Carmeli G, Lev-Dor R, Dard M, Nemcovsky CE (2008). Histomorphometric assessment of bone formation in sinus augmentation utilizing a combination of autogenous and hydroxyapatite/biphasic tricalcium phosphate graft materials: at 6 and 9 months in humans. *Clin Oral Implants Res* 19:686–692.

-

- Ashman A (2000). Ridge preservation: important buzzwords in dentistry. *Gen Dent* 48:304–12.
- Atwood DA, Coy WA (1971). Clinical, cephalometric, and densitometric study of reduction of residual ridges. *J Prosthet Dent* 26:280–95.
- Aubin J, Turksen K, Hersche J (1993). Osteoblastic cell lineage. In M Noda, editor *Cellular and Molecular Biology of Bone*. San Diego: Academic Press Inc, pp. 1–45.
- Avila G, Wang HL, Galindo-Moreno P, Misch CE, Bagramian RA, Rudek I, et al. (2010). The influence of the bucco-palatal distance on sinus augmentation outcomes. *J Periodontol* 81:1041–50.
- Bassi F, Procchio M, Fava C, Schierano G, Preti G (1999). Bone density in human dentate and edentulous mandibles using computed tomography. *Clin Oral Implants Res* 10:356–61.
- Block MS, Kent JN (1997). Sinus augmentation for dental implants: the use of autogenous bone. *J Oral Maxillofac Surg* 55:1281–6.
- Bonewald L (2006). Osteocytes as multifunctional cells. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 6:331–3.
- Bonewald LF (2011). The amazing osteocyte. *J Bone Min. Res* 26:229–238.
- Boyne PJ (1973). Implants and transplants: review of recent research in this area of oral surgery. *J Am Dent Assoc* 87:1074–1080.
- Boyne PJ, James RA (1980). Grafting of the maxillary sinus floor with autogenous marrow and bone. *J Oral Surg* 38:613–6.
- Browaeys H, Bouvry P, De Bruyn H (2007). A literature review on biomaterials in sinus augmentation procedures. *Clin Implant Dent Relat Res* 9:166–77.
- Bullough, Vigorita (1996). *Orthopaedic Pathology*. Third Edition. London: Mosby-Wolfe.
- Busenlechner D, Huber CD, Vasak C, Dobsak A, Gruber R, Watzek G (2009). Sinus augmentation analysis revised: the gradient of graft consolidation. *Clin Oral Implants Res* 20:1078–1083.
- Buser D (2009). *20 Years of Guided Bone Regeneration in Implant Dentistry*. Second. Chicago: Quintessence Publishing Co, Inc.
- Carano RAD, Filvaroff EH (2003). Angiogenesis and bone repair. *Drug Discov Today* 8:980–989.
- Cardaropoli G, Araújo M, Lindhe J (2003). Dynamics of bone tissue formation in tooth extraction sites. An experimental study in dogs. *J Clin Periodontol* 30:809–818.
- Carlsson GE, Bergman B, Hedegard B (1967). Changes in contour of the maxillary alveolar process under immediate dentures. A longitudinal clinical and x-ray cephalometric study covering 5 years. *Acta Odontol Scand* 25:45–75.

Carter SK (2000). Clinical strategy for the development of angiogenesis inhibitors. *Oncologist* 5 Suppl 1:51–54.

Choi BH, Kim BY, Huh JY, Lee SH, Zhu SJ, Jung JH, et al. (2006). Cyanoacrylate adhesive for closing sinus membrane perforations during sinus lifts. *J Craniomaxillofac Surg* 34:505–9.

Choi BH, Zhu SJ, Jung JH, Lee SH, Huh JY (2006). The use of autologous fibrin glue for closing sinus membrane perforations during sinus lifts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 101:150–4.

Cordaro L, Bosshardt DD, Palattella P, Rao W, Serino G, Chiapasco M (2008). Maxillary sinus grafting with Bio-Oss or Straumann Bone Ceramic: histomorphometric results from a randomized controlled multicenter clinical trial. *Clin Oral Implants Res* 19:796–803.

Cosci F, Luccioli M (2000). A new sinus lift technique in conjunction with placement of 265 implants: a 6-year retrospective study. *Implant Dent* 9:363–8.

Cullinan MP, Westerman B, Hamlet SM, Palmer JE, Faddy MJ, Lang NP, et al. (2001). A longitudinal study of interleukin-1 gene polymorphisms and periodontal disease in a general adult population. *J Clin Periodontol* 28:1137–44.

Davies JE (2003). Understanding peri-implant endosseous healing. *J Dent Educ* 67:932–949.

De Bruyn H, Collaert B (1994). The effect of smoking on early implant failure. *Clin Oral Implants Res* 5:260–4.

Degidi M, Artese L, Rubini C, Perrotti V, Iezzi G, Piattelli A (2007). Microvessel density in sinus augmentation procedures using anorganic bovine bone and autologous bone: 3 months results. *Implant Dent* 16:317–325.

Del Fabbro M, Rosano G, Taschieri S (2008). Implant survival rates after maxillary sinus augmentation. *Eur J Oral Sci* 116:497–506.

Del Fabbro M, Testori T, Francetti L, Weinstein R (2004). Systematic review of survival rates for implants placed in the grafted maxillary sinus. *Int J Periodontics Restor. Dent* 24:565–77.

DeLuca S, Zarb G (2006). The effect of smoking on osseointegrated dental implants. Part II: Peri-implant bone loss. *Int J Prosthodont* 19:560–6.

Diez A, Serrano S, Cucurull J, Marinoso L, Bosch J, Puig J, et al. (1997). Acute effects of ethanol on mineral metabolism and trabecular bone in Sprague-Dawley rats. *Calcif Tissue Int* 61:168–71.

Di Girolamo M, Napolitano B, Arullani CA, Bruno E, Di Girolamo S (2005). Paroxysmal positional vertigo as a complication of osteotome sinus floor elevation. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 262:631–3.

-

Duong LT, Rodan GA (1999). The role of integrins in osteoclast function. *J Bone Min. Metab* 17:1–6.

Einhorn TA, Majeska RJ, Rush EB, Levine PM, Horowitz MC (1995). The expression of cytokine activity by fracture callus. *J Bone Min. Res* 10:1272–1281.

Elgan C, Samsioe G, Dykes AK (2003). Influence of smoking and oral contraceptives on bone mineral density and bone remodeling in young women: a 2-year study. *Contraception* 67:439–47.

Elias J, Tang W, Howitz M (1995). Cytokine and hormonal stimulation of human osteosarcoma cytokine-11 production. *Endocrinology* 136:489–498.

Emmerich D, Att W, Stappert C (2005). Sinus floor elevation using osteotomes: a systematic review and meta-analysis. *J Periodontol* 76:1237–51.

Engelke W, Deckwer I (1997). Endoscopically controlled sinus floor augmentation. A preliminary report. *Clin Oral Implants Res* 8:527–31.

Eriksen E, Axelrod D, Melsen F (1994). Bone histology and bone histomorphometry. In E Eriksen, D Axelrod, and F Melsen, editors *Bone Histomorphometry*. New York: Raven Press, pp. 33–48.

Esposito M, Felice P, Worthington HV (2014). Interventions for replacing missing teeth: augmentation procedures of the maxillary sinus. *Cochrane Database Syst. Rev.* 5:CD008397.

Esposito M, Hirsch JM, Lekholm U, Thomsen P (1998). Biological factors contributing to failures of osseointegrated oral implants. (I). Success criteria and epidemiology. *Eur J Oral Sci* 106:527–51.

Ferreira CE, Novaes AB, Haraszthy VI, Bittencourt M, Martinelli CB, Luczyszyn SM (2009). A clinical study of 406 sinus augmentations with 100% anorganic bovine bone. *J Periodontol* 80:1920–7.

Fonseca RJ, Clark PJ, Burkes EJ, Baker RD (1980). Revascularization and healing of onlay particulate autologous bone grafts in primates. *J Oral Surg* 38:572–577.

Froum SJ, Tarnow DP, Wallace SS, Rohrer MD, Cho SC (1998). Sinus floor elevation using anorganic bovine bone matrix (OsteoGraf/N) with and without autogenous bone: a clinical, histologic, radiographic, and histomorphometric analysis--Part 2 of an ongoing prospective study. *Int J Periodontics Restor. Dent* 18:528–43.

Froum SJ, Wallace SS, Elian N, Cho SC, Tarnow DP (2006). Comparison of mineralized cancellous bone allograft (Puros) and anorganic bovine bone matrix (Bio-Oss) for sinus augmentation: histomorphometry at 26 to 32 weeks after grafting. *Int J Periodontics Restor. Dent* 26:543–51.

Fugazzotto PA (2008). Shorter implants in clinical practice: rationale and treatment results. *Int J Oral Maxillofac Implants* 23:487–96.

-

Fugazzotto PA, Vlassis J (1998). Long-term success of sinus augmentation using various surgical approaches and grafting materials. *Int J Oral Maxillofac Implants* 13:52–8.

Galindo-Moreno P, Avila G, Fernandez-Barbero JE, Aguilar M, Sanchez-Fernandez E, Cutando A, et al. (2007). Evaluation of sinus floor elevation using a composite bone graft mixture. *Clin Oral Implants Res* 18:376–82.

Galindo-Moreno P, Avila G, Fernandez-Barbero JE, Mesa F, O'Valle-Ravassa F, Wang HL (2008). Clinical and histologic comparison of two different composite grafts for sinus augmentation: a pilot clinical trial. *Clin Oral Implants Res* 19:755–9.

Galindo-Moreno P, Fauri M, Avila-Ortiz G, Fernandez-Barbero JE, Cabrera-Leon A, Sanchez-Fernandez E (2005). Influence of alcohol and tobacco habits on peri-implant marginal bone loss: a prospective study. *Clin Oral Implants Res* 16:579–86.

Galindo-Moreno P, Hernández-Cortés P, Aneiros-Fernández J, Camara M, Mesa F, Wallace S, et al. (2014). Morphological evidences of Bio-Oss® colonization by CD44-positive cells. *Clin Oral Implants Res* 25:366–371.

Galindo-Moreno P, Hernández-Cortés P, Mesa F, Carranza N, Juodzbaly G, Aguilar M, et al. (2013). Slow resorption of anorganic bovine bone by osteoclasts in maxillary sinus augmentation. *Clin Implant Dent Relat Res* 15:858–866.

Galindo-Moreno P, Moreno-Riestra I, Avila G, Fernandez-Barbero JE, Mesa F, Aguilar M, et al. (2010). Histomorphometric comparison of maxillary pristine bone and composite bone graft biopsies obtained after sinus augmentation. *Clin Oral Implants Res* 21:122–128.

Galindo-Moreno P, Moreno-Riestra I, Avila G, Padial-Molina M, Paya JA, Wang HL, et al. (2011). Effect of anorganic bovine bone to autogenous cortical bone ratio upon bone remodeling patterns following maxillary sinus augmentation. *Clin Oral Implants Res* 22:857–64.

Galindo-Moreno P, Moreno-Riestra I, Ávila-Ortiz G, Padial-Molina M, Gallas-Torreira M, Sánchez-Fernández E, et al. (2012). Predictive factors for maxillary sinus augmentation outcomes: a case series analysis. *Implant Dent* 21:433–440.

Galindo-Moreno P, Padial-Molina M, Avila G, Rios HF, Hernández-Cortés P, Wang H-L (2012). Complications associated with implant migration into the maxillary sinus cavity. *Clin Oral Implants Res* 23:1152–1160.

Galindo-Moreno P, Padial-Molina M, Fernandez-Barbero JE, Mesa F, Rodríguez-Martínez D, O'Valle F (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.

Galindo-Moreno P, Padial-Molina M, Sanchez-Fernandez E, Hernandez-Cortes P, Wang HL, O'Valle F (2011). Dental implant migration in grafted maxillary sinus. *Implant Dent* 20:400–5.

-

Galindo P, Sanchez-Fernandez E, Avila G, Cutando A, Fernandez JE (2005). Migration of implants into the maxillary sinus: two clinical cases. *Int J Oral Maxillofac Implants* 20:291–5.

Gonzalez Macias J, Serrano Figueras S (1995). Enfermedades óseas. In P Farreras, editor *Medicina Interna*. Madrid: Mosby-Doyma, pp. 1064–1089.

Goodacre CJ, Bernal G, Rungcharassaeng K, Kan JY (2003). Clinical complications with implants and implant prostheses. *J Prosthet Dent* 90:121–32.

Goodsell JO (1955). Surgical aids to intraoral prosthesis. *J Oral Surg* 13:8–34.

Guncu GN, Yildirim YD, Wang HL, Tozum TF (2011). Location of posterior superior alveolar artery and evaluation of maxillary sinus anatomy with computerized tomography: a clinical study. *Clin Oral Implants Res* 22:1164–7.

Gurley A, Roth S (1992). Bone. In S Sternberg, editor *Histology for pathologists*. New York: Raven Press, pp. 61–80.

Haas R, Donath K, Fodinger M, Watzek G (1998). Bovine hydroxyapatite for maxillary sinus grafting: comparative histomorphometric findings in sheep. *Clin Oral Implants Res* 9:107–16.

Hallman M, Hedin M, Sennerby L, Lundgren S (2002). A prospective 1-year clinical and radiographic study of implants placed after maxillary sinus floor augmentation with bovine hydroxyapatite and autogenous bone. *J Oral Maxillofac Surg* 60:277–84.

Hallman M, Sennerby L, Lundgren S (2002). A clinical and histologic evaluation of implant integration in the posterior maxilla after sinus floor augmentation with autogenous bone, bovine hydroxyapatite, or a 20:80 mixture. *Int J Oral Maxillofac Implants* 17:635–43.

Hising P, Bolin A, Branting C (2001). Reconstruction of severely resorbed alveolar ridge crests with dental implants using a bovine bone mineral for augmentation. *Int J Oral Maxillofac Implants* 16:90–7.

Huang Y-C, Kaigler D, Rice KG, Krebsbach PH, Mooney DJ (2005). Combined angiogenic and osteogenic factor delivery enhances bone marrow stromal cell-driven bone regeneration. *J Bone Min. Res* 20:848–857.

Iezzi G, Degidi M, Piattelli A, Mangano C, Scarano A, Shibli JA, et al. (2012). Comparative histological results of different biomaterials used in sinus augmentation procedures: a human study at 6 months. *Clin Oral Implants Res* 23:1369–1376.

Iezzi G, Scarano A, Mangano C, Cirotti B, Piattelli A (2008). Histologic Results From a Human Implant Retrieved Due to Fracture 5 Years After Insertion in a Sinus Augmented With Anorganic Bovine Bone. *J Periodontol* 79:192–198.

Jensen J, Sindet-Pedersen S (1991). Autogenous mandibular bone grafts and osseointegrated implants for reconstruction of the severely atrophied maxilla: a preliminary report. *J Oral Maxillofac Surg* 49:1277–1287.

-

Jensen OT, Shulman LB, Block MS, Iacono VJ (1998). Report of the Sinus Consensus Conference of 1996. *Int J Oral Maxillofac Implants* 13 Suppl:11–45.

Jensen SS, 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 Suppl:218–36.

Jensen T, Schou S, Gundersen HJG, Forman JL, Terheyden H, Holmstrup P (2013). Bone-to-implant contact after maxillary sinus floor augmentation with Bio-Oss and autogenous bone in different ratios in mini pigs. *Clin Oral Implants Res* 24:635–644.

Jilka RL (1998). Cytokines, bone remodeling and estrogen deficiency: A 1998 update. *Bone* 23:75–81.

Johnson K (1969). A study of the dimensional changes occurring in the maxilla following tooth extraction. *Aust Dent J* 14:241–4.

Kan JYK, Rungcharassaeng K, Kim J, Lozada JL, Goodacre CJ (2002). Factors affecting the survival of implants placed in grafted maxillary sinuses: a clinical report. *J Prosthet Dent* 87:485–489.

Katayama Y, House CM, Udagawa N, Kazama JJ, McFarland RJ, Martin TJ, et al. (1998). Casein kinase 2 phosphorylation of recombinant rat osteopontin enhances adhesion of osteoclasts but not osteoblasts. *J Cell Physiol* 176:179–87.

Katono T, Kawato T, Tanabe N, Tanaka H, Suzuki N, Kitami S, et al. (2009). Effects of nicotine and lipopolysaccharide on the expression of matrix metalloproteinases, plasminogen activators, and their inhibitors in human osteoblasts. *Arch Oral Biol* 54:146–55.

Keller EE, Tolman DE, Eckert S (1999). Surgical-prosthetic reconstruction of advanced maxillary bone compromise with autogenous onlay block bone grafts and osseointegrated endosseous implants: a 12-year study of 32 consecutive patients. *Int J Oral Maxillofac Implants* 14:197–209.

Kfir E, Kfir V, Mijiritsky E, Rafaeloff R, Kaluski E (2006). Minimally invasive antral membrane balloon elevation followed by maxillary bone augmentation and implant fixation. *J Oral Implant.* 32:26–33.

Kim MS, Lee JK, Chang BS, Um HS (2010). Benign paroxysmal positional vertigo as a complication of sinus floor elevation. *J Periodontal Implant Sci* 40:86–9.

Kinane DF, Lappin DF (2002). Immune processes in periodontal disease: a review. *Ann Periodontol* 7:62–71.

Kitten AM, Andrews CJ (2001). Endothelin-1 expression in long-term cultures of fetal rat calvarial osteoblasts: regulation by BMP-7. *J Cell Physiol* 187:218–225.

-

Klokkevold PR, Jovanovic SA (2002). Advanced implant surgery and bone grafting techniques. In HN Newman, HH Takei, and FAJ Carranza, editors *Carranza's Clinical Periodontology*. Philadelphia: W. B. Saunders, pp. 907–908.

Klueppel LE, Antonini F, Olate S, Nascimento FF, Albergaria-Barbosa JR, Mazzonetto R (2013). Bone repair is influenced by different particle sizes of anorganic bovine bone matrix: A histologic and radiographic study in vivo. *J Craniofac Surg* 24:1074–1077.

Knabe C, Koch C, Rack A, Stiller M (2008). Effect of beta-tricalcium phosphate particles with varying porosity on osteogenesis after sinus floor augmentation in humans. *Biomaterials* 29:2249–58.

Lahey LA, Akella R, Ranieri JP (2000). Angiogenesis: implications for tissue repair. In JE Davies, editor *Bone Engineering*. Toronto: EM Squared.

de Lange G, Tadjoeidin E (2002). Fate of the HA coating of loaded implants in the augmented sinus floor: a human case study of retrieved implants. *Int J Periodontics Restor. Dent* 22:287–96.

Lekholm U, Wannfors K, Isaksson S, Adielsson B (1999). Oral implants in combination with bone grafts. A 3-year retrospective multicenter study using the Branemark implant system. *Int J Oral Maxillofac Surg* 28:181–7.

Lekholm U, Zarb GA (1985). Patient selection and preparation. In PI Branemark, GA Zarb, and T Albertktsson, editors *Tissue integrated prostheses: osseointegration in clinical dentistry*. Quintessence, pp. 199–209.

Lekovic V, Camargo PM, Klokkevold PR, Weinlaender M, Kenney EB, Dimitrijevic B, et al. (1998). Preservation of alveolar bone in extraction sockets using bioabsorbable membranes. *J Periodontol* 69:1044–9.

Levin L, Herzberg R, Dolev E, Schwartz-Arad D (2004). Smoking and complications of onlay bone grafts and sinus lift operations. *Int J Oral Maxillofac Implants* 19:369–73.

Levin L, Ofec R, Grossmann Y, Anner R (2011). Periodontal disease as a risk for dental implant failure over time: a long-term historical cohort study. *J Clin Periodontol* 38:732–737.

Levin L, Schwartz-Arad D (2005). The effect of cigarette smoking on dental implants and related surgery. *Implant Dent* 14:357–361.

Lian J, Stein G (1992). Concepts of osteoblast growth and differentiation: basis for modulation of bone cell development and tissue formation. *Crit Rev Oral Biol Med* 3:269–305.

Lindquist LW, Carlsson GE, Jemt T (1997). Association between marginal bone loss around osseointegrated mandibular implants and smoking habits: a 10-year follow-up study. *J Dent Res* 76:1667–74.

Loomer PM, Ellen RP, Tenenbaum HC (1995). Characterization of inhibitory effects of suspected periodontopathogens on osteogenesis in vitro. *Infect Immun* 63:3287–96.

Lorenzetti M, Mozzati M, Campanino PP, Valente G (1998). Bone augmentation of the inferior floor of the maxillary sinus with autogenous bone or composite bone grafts: a histologic-histomorphometric preliminary report. *Int J Oral Maxillofac Implants* 13:69–76.

Lundgren S, Andersson S, Gualini F, Sennerby L (2004). Bone reformation with sinus membrane elevation: a new surgical technique for maxillary sinus floor augmentation. *Clin Implant Dent Relat Res* 6:165–73.

Lundgren S, Cricchio G, Palma VC, Salata LA, Sennerby L (2008). Sinus membrane elevation and simultaneous insertion of dental implants: a new surgical technique in maxillary sinus floor augmentation. *Periodontol 2000* 47:193–205.

Manolagas S, Jilka R (1995). Bone marrow, cytokines, and bone remodelling. Emerging insights into the pathophysiology of osteoporosis. *N Engl J Med* 332:305–311.

Martos Diaz P, Naval Gias L, Sastre Perez J, Gonzalez Garcia R, Bances del Castillo F, Mancha de la Plata M, et al. (2007). Sinus elevation by in situ utilization of bone scrapers: technique and results. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 12:E537–41.

Mayfield LJ, Skoglund A, Hising P, Lang NP, Attstrom R (2001). Evaluation following functional loading of titanium fixtures placed in ridges augmented by deproteinized bone mineral. A human case study. *Clin Oral Implants Res* 12:508–14.

McAllister BS, Haghighat K (2007). Bone augmentation techniques. *J Periodontol* 78:377–96.

McAllister BS, Margolin MD, Cogan AG, Buck D, Hollinger JO, Lynch SE (1999). Eighteen-month radiographic and histologic evaluation of sinus grafting with anorganic bovine bone in the chimpanzee. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants* 14:361–368.

de Melo WM, de Oliveira FS, Marcantonio E, Beloti MM, de Oliveira PT, Rosa AL (2014). Autogenous bone combined with anorganic bovine bone for maxillary sinus augmentation: analysis of the osteogenic potential of cells derived from the donor and the grafted sites. *Clin Oral Implants Res* 25:603–609.

Merx M a. W, Maltha JC, Stoelinga PJW (2003). Assessment of the value of anorganic bone additives in sinus floor augmentation: a review of clinical reports. *Int J Oral Maxillofac Surg* 32:1–6.

Mesa F, Munoz R, Noguero B, de Dios Luna J, Galindo P, O'Valle F (2008). Multivariate study of factors influencing primary dental implant stability. *Clin Oral Implants Res* 19:196–200.

Misch CE (1990). Divisions of available bone in implant dentistry. *Int J Oral Implant.* 7:9–17.

Misch CE, Dietsh F (1994). Endosteal implants and iliac crest grafts to restore severely resorbed totally edentulous maxillae--a retrospective study. *J Oral Implant.* 20:100–10.

-

- Misch CE, Judy KW (1987). Classification of partially edentulous arches for implant dentistry. *Int J Oral Implant.* 4:7–13.
- Misch CM (1997). Comparison of intraoral donor sites for onlay grafting prior to implant placement. *Int J Oral Maxillofac Implants* 12:767–76.
- Monje A, Chan H-L, Fu J-H, Suarez F, Galindo-Moreno P, Wang H-L (2013). Are short dental implants (<10 mm) effective? a meta-analysis on prospective clinical trials. *J Periodontol* 84:895–904.
- Monje A, Chan H-L, Suarez F, Galindo-Moreno P, Wang H-L (2012). Marginal bone loss around tilted implants in comparison to straight implants: a meta-analysis. *Int J Oral Maxillofac Implants* 27:1576–1583.
- Monje A, Fu J-H, Chan H-L, Suarez F, Galindo-Moreno P, Catena A, et al. (2013). Do implant length and width matter for short dental implants (<10 mm)? A meta-analysis of prospective studies. *J Periodontol* 84:1783–1791.
- Monje A, Monje F, Gonzalez-Garcia R, Suarez F, Galindo-Moreno P, Garcia-Nogales A, et al. (2015). Influence of atrophic posterior maxilla ridge height on bone density and microarchitecture. *Clin Implant Dent Relat Res* 17:111–119.
- Monje A, Suarez F, Galindo-Moreno P, García-Nogales A, Fu J-H, Wang H-L (2014). A systematic review on marginal bone loss around short dental implants (<10 mm) for implant-supported fixed prostheses. *Clin Oral Implants Res* 25:1119–1124.
- Mordenfeld A, Hallman M, Johansson CB, Albrektsson T (2010). Histological and histomorphometrical analyses of biopsies harvested 11 years after maxillary sinus floor augmentation with deproteinized bovine and autogenous bone. *Clin Oral Implants Res* 21:961–970.
- Mordenfeld A, Johansson CB, Albrektsson T, Hallman M (2014). A randomized and controlled clinical trial of two different compositions of deproteinized bovine bone and autogenous bone used for lateral ridge augmentation. *Clin Oral Implants Res* 25:310–320.
- Moy PK, Lundgren S, Holmes RE (1993). Maxillary sinus augmentation: histomorphometric analysis of graft materials for maxillary sinus floor augmentation. *J Oral Maxillofac Surg* 51:857–862.
- Mundy G (1993). Bone resorbing cells. In M Favus, editor *Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism*. New York: Raven Press, pp. 25–32.
- Murphy WL, Simmons CA, Kaigler D, Mooney DJ (2004). Bone regeneration via a mineral substrate and induced angiogenesis. *J Dent Res* 83:204–210.
- das Neves FD, Fones D, Bernardes SR, do Prado CJ, Neto AJ (2006). Short implants--an analysis of longitudinal studies. *Int J Oral Maxillofac Implants* 21:86–93.

Nkenke E, Stelzle F (2009). Clinical outcomes of sinus floor augmentation for implant placement using autogenous bone or bone substitutes: a systematic review. *Clin Oral Implants Res* 20 Suppl 4:124–33.

Noda M, Rittling SR, Muguruma Y, Asou Y, Yoshitake H, Tsuji K (1998). Osteopontin-deficient mice (OD-) cells exhibit enhanced actin fiber formation and spreading while OD-osteoclasts are less efficient in removing hydroxyapatite coated on glass and in recruitment to ectopically implanted bone matrix (abstract). *J Biomed Mater Res* 23:S220.

Noguerol B, Munoz R, Mesa F, de Dios Luna J, O'Valle F (2006). Early implant failure. Prognostic capacity of Periotest: retrospective study of a large sample. *Clin Oral Implants Res* 17:459–64.

O'Leary TJ, Drake RB, Naylor JE (1972). The plaque control record. *J Periodontol* 43:38.

Olson JW, Dent CD, Morris HF, Ochi S (2000). Long-term assessment (5 to 71 months) of endosseous dental implants placed in the augmented maxillary sinus. *Ann Periodontol* 5:152–156.

Owen T, Aronow M, Shalhoub V, Barone L, Wilming M, Tassinari M, et al. (1990). Progressive development of the rat osteoblast phenotype in vitro: reciprocal relationships in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of the bone extracellular matrix. *J Cell Physiol* 143:420–430.

Pacicca DM, Patel N, Lee C, Salisbury K, Lehmann W, Carvalho R, et al. (2003). Expression of angiogenic factors during distraction osteogenesis. *Bone* 33:889–898.

Padial Molina M (2010). Nanorugosidad y metilación superficial como factores modificadores del comportamiento osteoblástico en términos de proliferación, diferenciación y osteogénesis. Granada: Universidad de Granada. Available at: <http://www.tesisenred.net/handle/10803/17140> [Accessed November 11, 2015]

Pardinas Lopez S, Froum S, Khouly I (2015). Histomorphometric analysis of a biopsy harvested 10 years after maxillary sinus augmentation with anorganic bovine bone matrix and plasma rich in growth factors: A case report. *Implant Dent* 24:480–486.

Parfitt A (1994). Osteonal and hemi-osteonal remodeling: the spatial and temporal framework for signal traffic in adult human bone. *J Cell Physiol* 55:273–286.

Peleg M, Garg AK, Misch CM, Mazor Z (2004). Maxillary sinus and ridge augmentations using a surface-derived autogenous bone graft. *J. Oral Maxillofac. Surg.* 62:1535–44.

Perrotti V, Nicholls BM, Horton MA, Piattelli A (2009). Human osteoclast formation and activity on a xenogenous bone mineral. *J Biomed Mater Res A* 90:238–246.

Pfeilschifter J, Laukhuf F, Müller-Beckman B, Blum W, Pfister T, Ziegler R (1995). Parathyroid hormone increases the concentration of insulin-like growth factor I and transforming growth factor beta 1 in rat bone. *J Clin Invest* 96:767–774.

-

- Piattelli A, Degidi M, Di Stefano DA, Rubini C, Fioroni M, Strocchi R (2002). Microvessel density in alveolar ridge regeneration with autologous and alloplastic bone. *Implant Dent* 11:370–375.
- Piattelli M, Favero GA, Scarano A, Orsini G, Piattelli A (1999). Bone reactions to anorganic bovine bone (Bio-Oss) used in sinus augmentation procedures: a histologic long-term report of 20 cases in humans. *Int J Oral Maxillofac Implants* 14:835–840.
- Pietrokovski J, Massler M (1967). Ridge remodeling after tooth extraction in rats. *J Dent Res* 46:222–31.
- Pikos MA (1999). Maxillary sinus membrane repair: report of a technique for large perforations. *Implant Dent* 8:29–34.
- Pikos MA (2008). Maxillary sinus membrane repair: update on technique for large and complete perforations. *Implant Dent* 17:24–31.
- Pjetursson BE, Tan K, Lang NP, Bragger U, Egger M, Zwahlen M (2004)(a). A systematic review of the survival and complication rates of fixed partial dentures (FPDs) after an observation period of at least 5 years. *Clin Oral Implants Res* 15:667–76.
- Pjetursson BE, Tan K, Lang NP, Bragger U, Egger M, Zwahlen M (2004)(b). A systematic review of the survival and complication rates of fixed partial dentures (FPDs) after an observation period of at least 5 years. *Clin Oral Implants Res* 15:625–42.
- Pjetursson BE, Tan WC, Zwahlen M, Lang NP (2008). A systematic review of the success of sinus floor elevation and survival of implants inserted in combination with sinus floor elevation. *J Clin Periodontol* 35:216–40.
- Puzas J (1993). The osteoblast. In M Favus, editor *Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism*. New York: Raven Press, pp. 15–20.
- Qiu S, Rao DS, Fyhrie DP, Palnitkar S, Parfitt AM (2005). The morphological association between microcracks and osteocyte lacunae in human cortical bone. *Bone* 37:10–5.
- Radomsky ML, Thompson AY, Spiro RC, Poser JW (1998). Potential role of fibroblast growth factor in enhancement of fracture healing. *Clin Orthop Relat Res*:S283–293.
- Ramp WK, Lenz LG, Galvin RJ (1991). Nicotine inhibits collagen synthesis and alkaline phosphatase activity, but stimulates DNA synthesis in osteoblast-like cells. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 197:36–43.
- Rios HF, Avila G, Galindo P, Bratu E, Wang H-L (2009). The influence of remaining alveolar bone upon lateral window sinus augmentation implant survival. *Implant Dent* 18:402–412 10.1097/ID.0b013e3181b4af93.
- Rosenberg E, Rose LF (1998). Biologic and clinical considerations for autografts and allografts in periodontal regeneration therapy. *Dent Clin North Am* 42:467–90.

Rosenlicht JL, Tarnow DP (1999). Human histologic evidence of integration of functionally loaded hydroxyapatite-coated implants placed simultaneously with sinus augmentation: a case report 2 1/2 years postplacement. *J Oral Implant.* 25:7–10.

Sartori S, Silvestri M, Forni F, Cornaglia AI, Tesei P, Cattaneo V (2003). Ten-year follow-up in a maxillary sinus augmentation using anorganic bovine bone (Bio-Oss). A case report with histomorphometric evaluation. *Clin Oral Implants Res* 14:369–372.

Scarano A, Degidi M, Iezzi G, Pecora G, Piattelli M, Orsini G, et al. (2006). Maxillary sinus augmentation with different biomaterials: a comparative histologic and histomorphometric study in man. *Implant Dent* 15:197–207.

Schlegel KA, Fichtner G, Schultze-Mosgau S, Wiltfang J (2003). Histologic findings in sinus augmentation with autogenous bone chips versus a bovine bone substitute. *Int J Oral Maxillofac Implants* 18:53–8.

Schmitt CM, Moest T, Lutz R, Neukam FW, Schlegel KA (2015). Anorganic bovine bone (ABB) vs. autologous bone (AB) plus ABB in maxillary sinus grafting. A prospective non-randomized clinical and histomorphometrical trial. *Clin Oral Implants Res* 26:1043–1050.

Schropp L, Wenzel A, Kostopoulos L, Karring T (2003). Bone healing and soft tissue contour changes following single-tooth extraction: a clinical and radiographic 12-month prospective study. *Int J Periodontics Restor. Dent* 23:313–23.

Schuklenk U, Ashcroft R (2000). International research ethics. *Bioethics* 14:158–72.

Schwartz-Arad D, Levin L (2005). Intraoral autogenous block onlay bone grafting for extensive reconstruction of atrophic maxillary alveolar ridges. *J Periodontol* 76:636–41.

Serrano S, Mariñoso M (1990). Bases histológicas de la histomorfometría ósea. In S Serrano, J Aubia, and M Mariñoso, editors *Patología ósea metabólica*. Barcelona: Doyma, pp. 55–70.

Smiler DG, Johnson PW, Lozada JL, Misch C, Rosenlicht JL, Tatum OH Jr, et al. (1992). Sinus lift grafts and endosseous implants. Treatment of the atrophic posterior maxilla. *Dent Clin North Am* 36:151–86; discussion 187–8.

Soltan M, Smiler DG (2005). Antral membrane balloon elevation. *J Oral Implant.* 31:85–90.

Srouji S, Kizhner T, Ben David D, Riminucci M, Bianco P, Livne E (2009). The Schneiderian membrane contains osteoprogenitor cells: in vivo and in vitro study. *Calcif Tissue Int* 84:138–45.

Stein G, Lian J (1992). Molecular mechanisms mediating proliferation/differentiation interrelationships during progressive development of the osteoblast phenotype. *Endocr Rev* 14:424–442.

-

St John HC, Bishop KA, Meyer MB, Benkusky NA, Leng N, Kendzierski C, et al. (2014). The osteoblast to osteocyte transition: epigenetic changes and response to the vitamin D3 hormone. *Mol Endocrinol* 28:1150–1165.

Suárez-López Del Amo F, Ortega-Oller I, Catena A, Monje A, Khoshkam V, Torrecillas-Martínez L, et al. (2015). Effect of barrier membranes on the outcomes of maxillary sinus floor augmentation: a meta-analysis of histomorphometric outcomes. *Int J Oral Maxillofac Implants* 30:607–618.

Su GN, Tai PW, Su PT, Chien HH (2008). Protracted benign paroxysmal positional vertigo following osteotome sinus floor elevation: a case report. *Int J Oral Maxillofac Implants* 23:955–9.

Summers RB (1994)(a). A new concept in maxillary implant surgery: the osteotome technique. *Compendium* 15:152–6.

Summers RB (1994)(b). The osteotome technique: Part 2--The ridge expansion osteotomy (REO) procedure. *Compendium* 15:422, 424, 426, passim; quiz 436.

Summers RB (1994)(c). The osteotome technique: Part 3--Less invasive methods of elevating the sinus floor. *Compendium* 15:698, 700, 702–4 passim; quiz 710.

Summers RB (1995). The osteotome technique: Part 4--Future site development. *Compend Contin Educ Dent* 16:1090, 1092 passim; 1094–1096, 1098, quiz 1099.

Tadjoedin ES, de Lange GL, Bronckers AL, Lyaruu DM, Burger EH (2003). Deproteinized cancellous bovine bone (Bio-Oss) as bone substitute for sinus floor elevation. A retrospective, histomorphometrical study of five cases. *J Clin Periodontol* 30:261–70.

Tallgren A (1972). The continuing reduction of the residual alveolar ridges in complete denture wearers: a mixed-longitudinal study covering 25 years. *J Prosthet Dent* 27:120–32.

Tan K, Pjetursson BE, Lang NP, Chan ES (2004). A systematic review of the survival and complication rates of fixed partial dentures (FPDs) after an observation period of at least 5 years. *Clin Oral Implants Res* 15:654–66.

Tarnow DP, Wallace SS, Froum SJ, Rohrer MD, Cho SC (2000). Histologic and clinical comparison of bilateral sinus floor elevations with and without barrier membrane placement in 12 patients: Part 3 of an ongoing prospective study. *Int J Periodontics Restor. Dent* 20:117–25.

Tatum H Jr (1986). Maxillary and sinus implant reconstructions. *Dent Clin North Am* 30:207–29.

Tawil G, Mawla M (2001). Sinus floor elevation using a bovine bone mineral (Bio-Oss) with or without the concomitant use of a bilayered collagen barrier (Bio-Gide): a clinical report of immediate and delayed implant placement. *Int J Oral Maxillofac Implants* 16:713–21.

-

Taylor JC, Cuff SE, Leger JPL, Morra A, Anderson GI (2002). In vitro osteoclast resorption of bone substitute biomaterials used for implant site augmentation: a pilot study. *Int J Oral Maxillofac Implants* 17:321–330.

Termine J (1993). Bone matrix proteins and mineralization process. In M Favus, editor *Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism*. Nueva York: Raven Press, pp. 21–24.

Testori T, Del Fabbro M, Capelli M, Zuffetti F, Francetti L, Weinstein RL (2008). Immediate occlusal loading and tilted implants for the rehabilitation of the atrophic edentulous maxilla: 1-year interim results of a multicenter prospective study. *Clin Oral Implants Res* 19:227–32.

Thoma DS, Zeltner M, Hüsler J, Hämmerle CHF, Jung RE (2015). EAO Supplement Working Group 4 - EAO CC 2015 Short implants versus sinus lifting with longer implants to restore the posterior maxilla: a systematic review. *Clin Oral Implants Res* 26 Suppl 11:154–169.

Thor A, Sennerby L, Hirsch JM, Rasmusson L (2007). Bone formation at the maxillary sinus floor following simultaneous elevation of the mucosal lining and implant installation without graft material: an evaluation of 20 patients treated with 44 Astra Tech implants. *J Oral Maxillofac Surg* 65:64–72.

Thorwarth M, Schlegel KA, Wehrhan F, Srouf S, Schultze-Mosgau S (2006). Acceleration of de novo bone formation following application of autogenous bone to particulated anorganic bovine material in vivo. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 101:309–16.

Thorwarth M, Srouf S, Felszeghy E, Kessler P, Schultze-Mosgau S, Schlegel KA (2005). Stability of autogenous bone grafts after sinus lift procedures: a comparative study between anterior and posterior aspects of the iliac crest and an intraoral donor site. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 100:278–84.

Tolman DE (1995). Reconstructive procedures with endosseous implants in grafted bone: a review of the literature. *Int J Oral Maxillofac Implants* 10:275–94.

Tonetti MS, Claffey N, European Workshop in Periodontology group C (2005). Advances in the progression of periodontitis and proposal of definitions of a periodontitis case and disease progression for use in risk factor research. Group C consensus report of the 5th European Workshop in Periodontology. *J Clin Periodontol* 32 Suppl 6:210–213.

Tong DC, Rioux K, Drangsholt M, Beirne OR (1998). A review of survival rates for implants placed in grafted maxillary sinuses using meta-analysis. *Int J Oral Maxillofac Implants* 13:175–82.

Torres García-Denche J (2006). Influencia del Plasma Rico en Plaquetas en la Regeneración Ósea: Estudio Densitométrico y Morfométrico en calota de conejas osteoporóticas. [Tesis Doctoral]. Madrid: Universidad Rey Juan Carlos.

-

- Traini T, Valentini P, Iezzi G, Piattelli A (2007). A histologic and histomorphometric evaluation of anorganic bovine bone retrieved 9 years after a sinus augmentation procedure. *J Periodontol* 78:955–61.
- Tresguerres IF (1999). Influencia de la Hormona del crecimiento en la Osteointegración. [Tesis Doctoral]. Madrid: Universidad Complutense.
- Trisi P, Rao W (1999). Bone classification: clinical-histomorphometric comparison. *Clin Oral Implants Res* 10:1–7.
- Uchida Y, Goto M, Katsuki T, Akiyoshi T (1998). A cadaveric study of maxillary sinus size as an aid in bone grafting of the maxillary sinus floor. *J Oral Maxillofac Surg* 56:1158–63.
- Ulm C, Kneissel M, Schedle A, Solar P, Matejka M, Schneider B, et al. (1999). Characteristic features of trabecular bone in edentulous maxillae. *Clin Oral Implants Res* 10:459–67.
- Valentini P, Abensur D, Densari D, Graziani JN, Hammerle C (1998). Histological evaluation of Bio-Oss in a 2-stage sinus floor elevation and implantation procedure. A human case report. *Clin Oral Implants Res* 9:59–64.
- Van de Graaff KM (1998). Human Anatomy. 5th Edition. Boston: McGraw-Hill.
- Van der Weijden F, Dell'Acqua F, Slot D (2009). Alveolar bone dimensional changes of post-extraction sockets in humans: a systematic review. *J Clin Periodontol* 36:1048–1058.
- Vandeweghe S, Leconte C, Ono D, Coelho PG, Jimbo R (2013). Comparison of histological and three-dimensional characteristics of porous titanium granules and deproteinized bovine particulate grafts used for sinus floor augmentation in humans: A pilot study. *Implant Dent* 22:339–343.
- Vercellotti T, De Paoli S, Nevins M (2001). The piezoelectric bony window osteotomy and sinus membrane elevation: introduction of a new technique for simplification of the sinus augmentation procedure. *Int J Periodontics Restor. Dent* 21:561–7.
- Verdugo F, Castillo A, Moragues MD, Ponton J (2009). Bone microbial contamination influences autogenous grafting in sinus augmentation. *J Periodontol* 80:1355–64.
- Vernamonte S, Mauro V, Messina AM (2011). An unusual complication of osteotome sinus floor elevation: benign paroxysmal positional vertigo. *Int J Oral Maxillofac Surg* 40:216–8.
- Wallace RH (2000). The relationship between cigarette smoking and dental implant failure. *Eur J Prosthodont Restor Dent* 8:103–6.
- Wallace SS, Froum SJ (2003). Effect of maxillary sinus augmentation on the survival of endosseous dental implants. A systematic review. *Ann Periodontol* 8:328–43.
- Wang HL, Katranji A (2008). ABC sinus augmentation classification. *Int J Periodontics Restor. Dent* 28:383–9.

Ward KD, Klesges RC (2001). A meta-analysis of the effects of cigarette smoking on bone mineral density. *Calcif Tissue Int* 68:259–70.

Watson P, Lazowski D, Han V, Fraher L, Steer B, Hodsmann (1995). Parathyroid hormone restores bone mass and enhances osteoblast insulin-like growth factor I gene expression in ovariectomized rats. *Bone* 16:357–365.

Watzek G, Fürst G, Gruber R (2006). Biologic basis of sinus grafting. In OT Jensen, editor *The sinus bone graft*. Hanover Park, IL: Quintessence Books, pp. 13–26.

Wheeler SL (1997). Sinus augmentation for dental implants: the use of alloplastic materials. *J Oral Maxillofac Surg* 55:1287–93.

Wiltfang J, Schlegel KA, Schultze-Mosgau S, Nkenke E, Zimmermann R, Kessler P (2003). Sinus floor augmentation with beta-tricalciumphosphate (beta-TCP): does platelet-rich plasma promote its osseous integration and degradation? *Clin Oral Implants Res* 14:213–218.

Yamate T, Mocharla H, Taguchi Y, Igietseme JU, Manolagas SC, Abe E (1997). Osteopontin expression by osteoclast and osteoblast progenitors in the murine bone marrow: demonstration of its requirement for osteoclastogenesis and its increase after ovariectomy. *Endocrinology* 138:3047–55.

Yao Z, Lafage-Proust M-H, Plouët J, Bloomfield S, Alexandre C, Vico L (2004). Increase of both angiogenesis and bone mass in response to exercise depends on VEGF. *J Bone Min. Res* 19:1471–1480.

Yildirim M, Spiekermann H, Handt S, Edelhoff D (2001). Maxillary sinus augmentation with the xenograft Bio-Oss and autogenous intraoral bone for qualitative improvement of the implant site: a histologic and histomorphometric clinical study in humans. *Int J Oral Maxillofac Implants* 16:23–33.

Zerbo IR, Bronckers AL, de Lange G, Burger EH (2005). Localisation of osteogenic and osteoclastic cells in porous beta-tricalcium phosphate particles used for human maxillary sinus floor elevation. *Biomaterials* 26:1445–51.

Zerbo IR, Zijdeveld SA, de Boer A, Bronckers ALJJ, de Lange G, ten Bruggenkate CM, et al. (2004). Histomorphometry of human sinus floor augmentation using a porous beta-tricalcium phosphate: a prospective study. *Clin Oral Implants Res* 15:724–732.

Zhang H, Lewis CG, Aronow MS, Gronowicz GA (2004). The effects of patient age on human osteoblasts' response to Ti-6Al-4V implants in vitro. *J Orthop Res* 22:30–8.

Zinner ID, Small SA (1996). Sinus-lift graft: using the maxillary sinuses to support implants. *J Am Dent Assoc* 127:51–7.

-

ANEXOS

INDICIOS DE CALIDAD DE LAS PUBLICACIONES

Para la determinación de los indicios de calidad que a continuación se exponen se ha realizado una búsqueda de la revista y año de publicación en el Journal of Citation Reports. Para las citas recibidas se ha utilizado la base de datos Web of Knowledge.

1. Galindo-Moreno P, **Moreno-Riestra I**, Ávila G, Fernández-Barbero JE, Mesa F, Aguilar M, Wang H-L, O'Valle F. Histomorphometric comparison of maxillary pristine bone and composite bone graft biopsies obtained after sinus augmentation. *Clinical Oral Implants Research*, 2010;21(1):122-128.
 - Impacto: 2,812
 - Orden: 7/77
 - Cuartil: 1
 - Citas recibidas: 23 (a 5 de noviembre de 2015)
2. Galindo-Moreno P, **Moreno-Riestra I**, Avila G, Padial-Molina M, Paya JA, Wang H-L, O'Valle F. Effect of anorganic bovine bone to autogenous cortical bone ratio upon bone remodeling patterns following maxillary sinus augmentation. *Clinical Oral Implants Research*, 2011;22(8):857-864.
 - Impacto: 2,514
 - Orden: 13/81
 - Cuartil: 1
 - Citas recibidas: 14 (a 5 de noviembre de 2015)
3. Galindo-Moreno P, **Moreno-Riestra I**, Ávila-Ortiz G, Padial-Molina M, Gallas-Torreira M, Sánchez-Fernández E, Mesa F, Wang HL, O'Valle F. Predictive factors for maxillary sinus augmentation outcomes: a case series analysis. *Implant Dentistry*, 2012;21(5):433-440.
 - Impacto: 1,404
 - Orden: 36/83
 - Cuartil: 2
 - Citas recibidas: 4 (a 5 de noviembre de 2015)

Pablo Galindo-Moreno
 Ildefonso Moreno-Riestra
 Gustavo Ávila
 Juan Emilio
 Fernández-Barbero
 Francisco Mesa
 Mariano Aguilar
 Hom-Lay Wang
 Francisco O'Valle

Histomorphometric comparison of maxillary pristine bone and composite bone graft biopsies obtained after sinus augmentation

Authors' Affiliations:

Pablo Galindo-Moreno, Oral Surgery and Implant Dentistry Department, School of Dentistry, University of Granada, Granada, Spain
 Ildefonso Moreno-Riestra, Gustavo Ávila, Hom-Lay Wang, Department of Periodontics and Oral Medicine, School of Dentistry, University of Michigan, Ann Arbor (MI), USA
 Juan Emilio Fernández-Barbero, Human Anatomy and Embryology Department, School of Medicine, University of Granada, Granada, Spain
 Francisco Mesa, Periodontology Department, School of Dentistry, University of Granada, Spain
 Mariano Aguilar, Francisco O'Valle, Pathology Department, School of Medicine, University of Granada, Granada, Spain

Correspondence to:

Dr Pablo Galindo-Moreno
 C/Recogidas
 39 5° Izq
 18005 Granada
 Spain
 Tel.: +34 958 520658
 Fax: +34 958 520658
 e-mail: pgalindo@ugr.es

Key words: anorganic bovine bone, autologous bone, bone remodeling, dental implants, sinus grafting

Abstract

Introduction: Sinus grafting is a technique oriented to facilitate implant placement in posterior atrophic maxillae. Several modifications of the original technique and a wide variety of materials have been proposed; most of them associated with implant survival rates. However, the quality of the bone obtained after the application of certain grafting materials has not been fully elucidated yet. The aims of this multicenter study were to analyse histomorphometrical samples obtained 6 months after sinus grafting using a composite graft consisting of anorganic bovine bone (ABB) + autologous bone (AB), and to compare these samples with maxillary pristine bone biopsies.

Material and methods: Ninety maxillary sinus augmentations were performed for delayed implant placement ($N=90$) in 45 consecutive patients (test group). Bone cores were harvested 6 months after grafting for histomorphometric and ultrastructural study. Control pristine bone biopsies were taken from the posterior maxilla of 10 patients (control). Bone radiographic changes were assessed up to 24 months after implant loading.

Results: The total mean values after analysis of test cores revealed a proportion of $46.08 \pm 16.6\%$ of vital bone, $42.27 \pm 15.1\%$ of non-mineralized connective tissue, and $37.02 \pm 25.1\%$ of the remaining ABB particles. Significant bone remodeling activities were noticed in sinus grafting samples when compared with pristine bone. A statistically significant difference was observed in the number of osteoid lines between two groups, with higher values in the test one ($15.1 \pm 11.48\%$ vs. $2.5 \pm 2.2\%$, $P=0.0005$).

Ultrastructural study showed that vital trabecular bone was in intimal contact with ABB particles. Radiographic analysis revealed that the higher the proportion of remaining ABB, the lower the total vertical resorption of the graft.

Conclusion: Sinus grafting constitutes an excellent model for the study of *de novo* bone formation patterns and graft consolidation, when a combination of different bone substitutes is applied. The combination of ABB + AB yields highly satisfactory outcomes from both a clinical and a histologic perspective.

Date:

Accepted 22 June 2009

To cite this article:

Galindo-Moreno P, Moreno-Riestra I, Ávila G, Fernández-Barbero JE, Mesa F, Aguilar M, Wang H-L, O'Valle F. Histomorphometric comparison of maxillary pristine bone and composite bone graft biopsies obtained after sinus augmentation. *Clin. Oral Impl. Res.* 21, 2010; 122–128.
 doi: 10.1111/j.1600-0501.2009.01814.x

Bone availability is the key for successful implant placement (Block & Kent 1997). Implant primary stability is often challenging in the posterior segments of the maxilla. This is because of the poor osseous density typically found in this region, insufficient bone availability mainly due to

sinus pneumatization, and alveolar bone atrophy as a consequence of tooth loss (Yildirim et al. 2000). Although the use of short or tilted implants has been shown to be a suitable therapeutic option to overcome these obstacles (Aparicio et al. 2001; Morand & Irinakakis 2007), in cases of

anatomical limitations and consideration of prosthesis long-term biomechanical stability, sinus grafting has emerged as a good option for implant site development to facilitate implant placement.

Since the early introduction of sinus grafting in implant dentistry (Boyne & James 1980), several modifications of this technique have been proposed in the literature throughout the last two decades (Tatum 1986; Summers 1998). Bone grafting material selection is one of the differential factors that may play a significant role in sinus grafting outcomes. The search for an ideal bone grafting material that would enable clinicians to obtain the best mature bone formation in the shortest period of time, with minimal complications, is one of the most investigated topics in this field. Anorganic bovine bone (ABB) is a biocompatible material that presents similar structure and physical properties as human cancellous bone. When ABB combines with autogenous bone, it may represent an excellent grafting material for maxillary sinus augmentation (Wallace & Froum 2003). Autologous bone (AB) provides cellularity and growth factors while ABB facilitates space maintenance and slows down the process of rapid bone remodeling of AB. This may be explained by ABB's slow resorption rate and its osteoconductive properties (Schlegel et al. 2003).

A modified sinus grafting technique using a bone scraper to simultaneously access the Schneiderian's membrane and collect a part of the bone that lines the lateral wall of the sinus cavity, to be later used as a grafting material in combination with ABB, has been previously proposed by our group (Galindo-Moreno et al. 2007). Several authors have reported excellent clinical outcomes after using a combination of ABB and AB for sinus grafting (Yildirim et al. 2001; Hallman et al. 2002; Galindo-Moreno et al. 2008). In spite of this, little information is available regarding the biologic response after performing sinus grafting using a combination of xenogenic material (ABB) and autogenous bone (AB). Therefore, the main aim of the present study was to analyse, morphologically and histomorphometrically, samples obtained 6 months after sinus grafting of grafted sinuses of human subjects using a composite graft consisting of ABB + AB, and to find out the differences with maxillary pristine bone.

Material and methods

Study design

In this multicenter, prospective, controlled clinical study, 45 patients (28 males and 17 females) in need of a bilateral sinus grafting procedure to allow replacement of missing posterior maxillary teeth with implant-supported restorations were recruited for the study after informed consent. Information regarding medical and dental history was recorded following a questionnaire. To be included in the study, patients had to be adults between 18 and 85 years of age, present a physical status according to the American Society of Anesthesiologists (ASA) of I or II, have neither an uncontrolled systemic disease nor a condition known to alter bone metabolism (i.e. osteoporosis, diabetes mellitus . . . , etc), adequate oral hygiene (O'Leary plaque score $\leq 20\%$), and have < 5 mm bone height remaining after radiographic measurement over panoramic films (Zinner & Small 2004). Subjects who had taken antibiotics in the previous 3 months, or reported long-term use (> 6 months) of medications known to modify bone metabolism (such as bisphosphonates, corticosteroids . . . , etc), women who were pregnant or attempting to get pregnant at the time of the screening, and patients who presented existing sinus conditions, sepsis, a history of cancer and/or radiation to the oral cavity, or complications derived from any of these conditions affecting the sinus area were excluded from the study.

A total of 90 grafting procedures were conducted. Patients underwent a delayed implant placement approach. Additionally, 10 subjects (five males and five females) consented in order to harvest control biopsies. Ten pristine bone core biopsies were harvested from the posterior maxilla at the time of implant placement from sites where bone grafting was not necessary.

This study was conducted according to the principles of WHO Declaration of Helsinki (Schuklenk & Ashcroft 2000).

Surgical and restorative procedure

All patients took 875/125 mg of amoxicillin/clavulanic acid, every 8 h starting 1 day before the surgery. Clindamycin, 300 mg every 8 h, was prescribed to penicillin-allergic patients. This medication was maintained for 7 additional days. All sur-

gical procedures were performed under local anesthesia (Ultracain[®], Aventis Inc., Frankfurt, Germany). A modification of the conventional lateral wall approach was used to perform the sinus grafting in all patients. A bone scraper (Safe scraper[®], Meta corp., Remigia, Italy) was used to harvest autologous cortical bone and to expose the Schneiderian membrane. After membrane elevation, all sinus cavities were grafted with AB in combination ABB (Bio-Oss[®] particle size 250–1000 μm – Geistlich Pharma AG, Wolhusen, Switzerland), mixed in a 1:1 volume ratio. After bone grafting, an absorbable collagen membrane (Bio-Gide[®] – Geistlich Pharma AG) was placed over the window to minimize soft tissue invasion. Primary closure was achieved in all cases, suturing with 3–0 silk suture (Laboratorio Aragón, Barcelona, Spain).

After a 6-month healing period, a 3-mm internal diameter, 4-mm external diameter trephine was used to collect bone core biopsies from the sites where implants had to be placed, according to the restorative plan. Hence, the initial osteotomy was performed using a trephine, and not with the conventional drills of each implant system. According to the study protocol, just one bone core per sinus was analyzed for conventional histological and histomorphometrical study. The implant placed in the ideal position of the maxillary first molar was the preferred site for bone sample collection. Other cores were taken from different implant positions for ultrastructural analysis. A total of 90 implants represented the group that was followed up: 52 Microdent[®] (Microdent Implant System, Barcelona, Spain) and 38 Astra Tech (Osseospeed[™], Astra Tech, Mölndal, Sweden) with a range 13–16 mm of length and 4.2–5 mm of width. A staged approach was performed in all cases; therefore, 6 months after implant placement, a second-stage surgery was performed. After soft tissue healing, impressions were taken. The final screw-retained implant-supported PFM crowns were delivered – approximately 2 weeks later – and an occlusal adjustment was performed. After implant loading, all patients were placed in a 3-month maintenance program.

Radiographic variables

Standardized digital panoramic films of each patient were obtained before and immediately after sinus grafting surgery,

before implant insertion, at the time of prosthesis delivery, and 24 months after functional loading (Kodak ACR-2000, Eastman Kodak Company, Rochester, NY, USA). Total bone height, at the point of shortest remaining alveolar bone preoperatively, as well as the maximum vertical augmentation after grafting and on the day of implant placement was measured by the same examiner using a specific software (Digident Dent-A-View Version 1.0, DigiDent, DIT, Nesher, Israel).

Histological study

Bone core biopsies were fixed in 10% buffered formalin for 24 h. They were subsequently decalcified in a decalcifier containing formaldehyde (10% w/v), formic acid (8% w/v), and methanol (1% w/v) (Surgipath® Europe Ltd., Peterborough, UK), for at least 8 days, and then embedded in paraffin. Sections were dewaxed, hydrated, and 4 µm sections following the central axis of the biopsies were obtained and stained with Hematoxylin-Eosin, periodic acid Schiff's, Masson's trichrome, and Goldner's trichrome techniques. A millimeter scale in the eyepiece of a microscope BH2 (Olympus Optical Company, Ltd., Tokyo, Japan) with a ×40 objective was used to count the osteoblasts, osteoclasts, and osteocytes per mm². The results were expressed as the number of positive cells per mm².

Bone histomorphometry was performed semi-automatically on Masson trichrome-stained sections, assessing 10 randomized images with ×10 objective, using a microscope equipped with a digital camera DP70 (Olympus) connected to a computer, and applying ImageJ software (NIH, USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Separate quantifications of vital bone, ABB particles, and non-mineralized tissue were performed and expressed as percentages of each compartment. The number of osteoid lines on the whole length of the biopsy core was also recorded.

Electron microscopy study

Several 1 mm² fragments, obtained at three different levels of each sample (coronal, medial, and apical), including trabecular and cortical bone, were fixed in 2.5% glutaraldehyde solution for 24 h and subsequently decalcified for 8 days (Decalcifier I®, Surgipath® Europe Ltd., Peterborough, UK). Samples were then postfixated in 1% OsO₄ at 4 °C for 2 h, washed in distilled

water, dehydrated in increasing concentrations of acetone, and embedded in Epon. Semithin sections were stained with toluidine blue solution. Ten blocks of LC cluster areas were sampled. Ultrathin (about 70 nm thick) sections were obtained using an ultramicrotome (Reichert-Jung ULTRACUT E, Leica Microsystems, Barcelona, Spain) and stained with lead citrate and uranyl acetate. Sections were examined with a transmission electron microscope (Zeiss EM 902, Barcelona, Spain) and processed using analySIS® for Windows (Soft Imaging System, Münstes, Germany).

Statistical analysis

A multilevel model technique with the Box & Cox transformation was carried out and a Skewness/Kurtosis test was used to determine the normality of the variables. Because of the high values of intraclass correlation coefficient and non-normal distribution of variables, we decided to use each patient separately as the unit analysis. This was chosen in order to eliminate inpatient variable high resemblance; hence, we calculated the average value of each variable taken of each patient (considering both sinuses). This required to redefine a new statistical sample where the 'n' value was 45, which finally accounted for non-related samples from 45 different patients to determine the statistical significance of the findings. As a consequence, Welch's *t*-test for values with different variance and Pearson's correlation with transformed data were assessed. A *P*-value of <0.05 was considered statistically significant. Statistical analysis was performed using specialized software [STATA 10.1 program, StataCorp LP, TX, USA, and SPSS-Windows 15.0 program, SPSS Inc., Chicago (IL), USA].

Results

Patients

Patients' age ranged from 35 to 72 years (mean 50.4 years) in the test group. On the other hand, control patients' ages ranged from 38 to 61 years (mean 48.3 years). Only one perforation of the Schneiderian membrane after elevation and no other complications related to the grafting technique was observed over the study period. At the time of harvesting the bone core

biopsy, all cores presented similar dimensions (approximately 14 mm). All patients completed the study.

Radiographic parameters

The most significant finding regarding radiographic changes was that more bone resorption was observed in patients whose biopsies showed a lower proportion of ABB particles (<30% ABB: 0.42 ± 0.13 mm vs. ≥30% ABB: 0.21 ± 0.1 mm, *P*=0 Welch's test), and a higher proportion of non-mineralized tissue (nMT) (<40% nMT: 0.22 ± 0.11 mm vs. ≥40% nMT: 0.39 ± 0.14 mm, *P*=0.01 Welch's test).

Morphologic and histomorphometric analysis

Analysis of maxillary pristine bone biopsies (Fig. 1a) revealed the presence of mineralized tissue, including mainly trabecular bone, and bone marrow. The mean values after morphometric analysis showed a predominance of bone marrow with adipocytes (51.2 ± 8.1%), while mineralized tissue was found in a lower (45.7 ± 7.9%), but similar proportion (Table 1). A scant number of osteoid lines were observed in association with mineralized structures. The number of osteoblasts, osteoclasts, and osteocytes per squared millimeter is also shown in Table 1.

Woven and lamellar type of trabecular bone, in the presence of ABB particles, was observed in samples obtained from patients who underwent sinus augmentation, after 6 months of healing (Fig. 1b). At this time, biopsies from sinus floor elevation showed trabecular bone in a wide range of proportion (from 29.5% to 75%), with normally appearing bone marrow and ABB particles in and between the trabecular bone, with an appearance of a 'terrazzo floor', especially in the apical portion of the sample (Fig. 2).

The total mean values after image analysis revealed a proportion of 46.1 ± 16.6% of vital bone, 42.3 ± 15.1% of non-mineralized tissue, and 37 ± 25.1% of remaining ABB particles. Significant bone remodeling activities were noticed in sinus grafting samples as compared with pristine bone. For example, a statistically significant difference in the number of osteoid lines was observed between the two groups, with higher values in the test group (15.1 ± 11.48% vs. 2.5 ± 2.2%, *P*=0.0005) (Table 1). No acute or chronic inflammatory cell

infiltrate or foreign body reactions were observed in any sample, other than a tendency from the osteoclasts to show activity around ABB particles (Fig. 3). Ultrastructural study showed that vital trabecular bone was in intimal contact with ABB

particles. Also, cement lines between vital bone and ABB were observed (Fig. 4a), a finding that was previously observed under light microscopy as well (Fig. 4b).

Non-mineralized tissue appeared to be directly correlated with osteoblast number

per mm² ($\rho = 0.329$, $P = 0.043$). In fact, stratified data analysis of samples depending on the proportion of non-mineralized tissue showed that there was a significant difference in osteoblasts/mm² when the proportion of interposed soft tissue was higher than 40% ($\geq 40\%$ mean 344.9 ± 284 vs. $<40\%$ 88.7 ± 59 , $P = 0.0008$ Welch's test), but the number of osteoid lines was not significant (21.25 ± 8.64 vs. 12.42 ± 11.68 , $P = 0.99$ Welch's test). However, the remaining ABB particle proportion seemed to be important for osteoid formation ($r = 0.509$, $P = 0.001$), as a significant increase of osteoid lines was observed when ABB proportion was higher than 30% (19.32 ± 9.01 vs. 12.69 ± 12.22 , $P = 0.012$, Welch's test). Table 2 shows the Pearson's correlation coefficients between morphometric variables.

Discussion

Primary stability is one of the key factors for successful osseointegration. It is widely

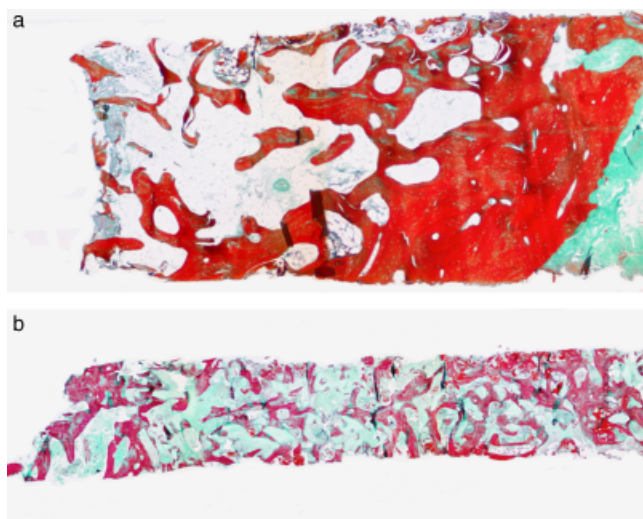


Fig. 1. (a) Bone core biopsy obtained from the pristine bone group that showed cortical and trabecular bone formation (Masson trichrome $\times 4$ – scale bar 1 mm). (b) Bone core biopsy from the test group (sinus grafting using autologous and xenogenous bone) (Masson trichrome $\times 2$ – scale bar 1 mm).

Table 1. Morphometric comparison between pristine maxillary bone and grafted bone core biopsies after sinus augmentation

Variables	Pristine bone (N=10)	Grafted bone (N=45)	P-values (Welch's test)
Osteoblasts (no./mm ²)	247.31 \pm 251.6*	267.26 \pm 266.3	0.92
Osteoclasts (no./mm ²)	48.38 \pm 72.13	151.1 \pm 192.74	0.51
Osteocytes (no./mm ²)	1575.28 \pm 196.94	1042.66 \pm 807.96	0.0006
Osteoid lines (no.)	2.5 \pm 2.17	15.1 \pm 11.48	0.0005
Vital bone (%)	45.73 \pm 7.98	46.08 \pm 16.63	0.81
Anorganic bovine bone (%)	–	37.02 \pm 25.09	–
Non-mineralized connective tissue (%)	51.23 \pm 8.1	42.27 \pm 15.1	0.12

*Values are expressed as mean \pm standard deviation.

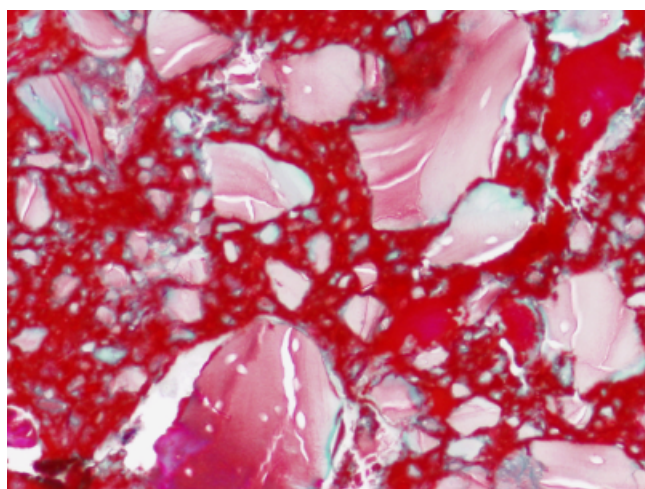


Fig. 2. Bone core biopsy from the test group (sinus grafting using autologous and xenogenous bone) showing a 'terrazzo-floor' image due to microparticulation of anorganic bovine bone (Masson trichrome $\times 20$).

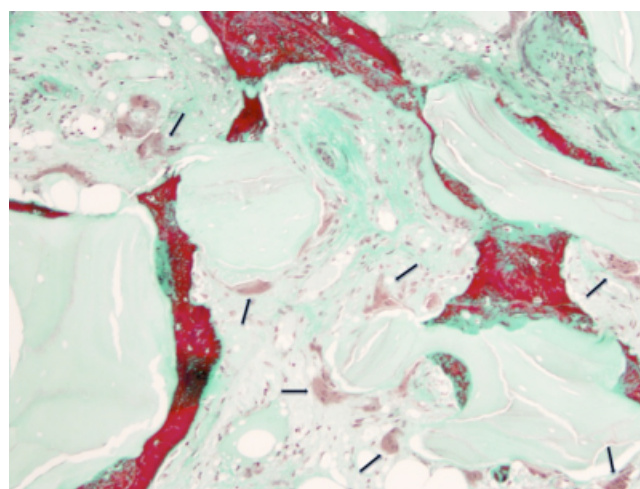


Fig. 3. Bone core biopsy from the test group with numerous osteoclasts (arrows) around the anorganic bovine bone particles (Masson trichrome $\times 20$).

acknowledged that primary stability is highly associated with the proportion of mineralized tissue present in a particular location (Turkyilmaz et al. 2007; Turkyilmaz 2008). Therefore, a lack of bone height in the posterior maxilla often requires bone augmentation before implant placement. Sinus grafting is aimed at increasing the

amount of available bone in the posterior segments of the maxilla, thus providing an adequate condition for osseointegration after implant placement. The aims of the present study were to evaluate the bone maturation status and histomorphometric features of samples obtained 6 months after sinus grafting, and to compare these parameters with a

pristine bone control. Mineralized vital bone proportion in maxillary pristine bone varies depending on the age and gender, ranging from 23% to 28% as shown by previous studies (Trisi & Rao 1999; Ulm et al. 1999). In the present study, the mean proportion of mineralized vital bone was found to be $45.73 \pm 7.98\%$, which is significantly higher than the values reported by other authors. This difference may be explained by the low number of subjects analysed and the particular characteristics of our population. A high percentage of vital bone was noted in pristine bone sections, but it had less signs of bone remodeling when compared with sinus grafting samples.

Sinus grafting success may be evaluated by performing a histologic analysis to determine the features and the amount of newly formed bone that could potentially be in intimal contact with an implant fixture placed in the grafted area (Yildirim et al. 2000). Thus, it has been proposed that maximum osteogenesis of qualitatively high-grade living bone can be used as a way to assess the success outcome of sinus augmentation (Wallace et al. 1996). In a previous pilot study, our group found that the mean value for mineralized vital bone was approximately 31% (Galindo-Moreno et al. 2008). This percentage is in accordance with the results previously reported, which found a similar % of vital bone (ranged from 22.2% to 34.2%) in their samples (Yildirim et al. 2000; Froum et al. 2008; Simunek et al. 2008). In contrast, the mean percentage of vital bone obtained in the present series is one of the highest reported so far for this particular combination of biomaterials (46.08%), closely followed by the results reported by Cordaro and colleagues (45.2%) and by Artzi and colleagues (41.6% after 9 months) (Artzi et al. 2008;

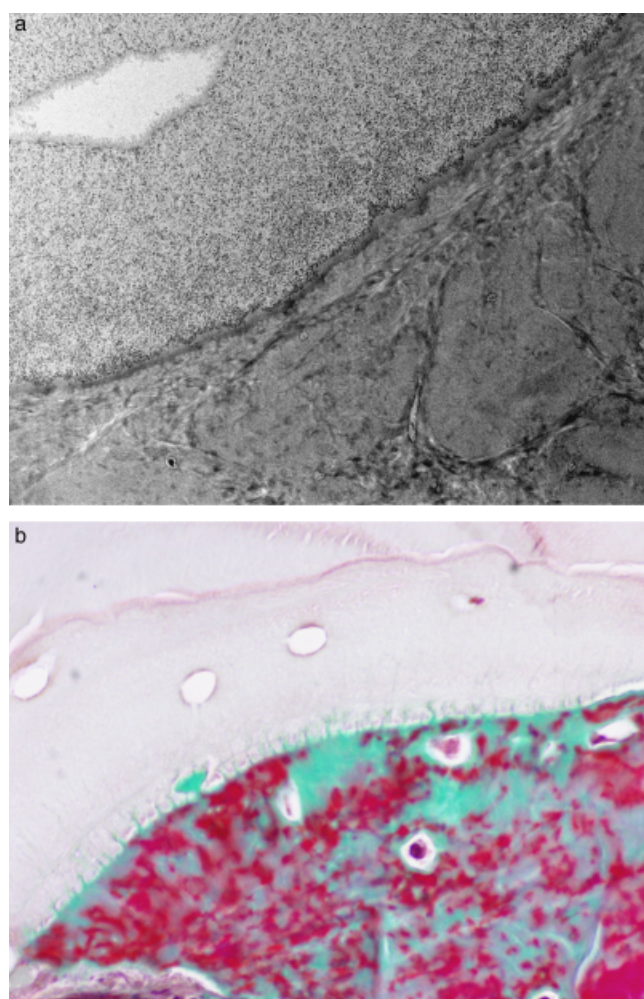


Fig. 4. A narrow relationship between trabecular bone and ABB particles in the absence of gaps or fibrous interface: (a) ultrastructural image of a cement line between ABB particles and decalcified vital bone (TEM $\times 4600$), (b) light microscopy (Masson trichrome $\times 100$).

Table 2. Statistical correlations between morphometric variables in grafted bone core biopsies after sinus augmentation

	Osteoblasts (mm ²)	Osteoclasts (mm ²)	Osteocytes (mm ²)	Vital bone (%)	Osteoid lines (no.)	ABB particles (%)	Connective Tissue (%)
Osteoblasts (mm ²)	1*						
Osteoclasts (mm ²)	0.345 (0.033)	1					
Osteocytes (mm ²)	0.676 (0)	0.193 (0.245)	1				
Vital bone (%)	0.454 (0.004)	0.325 (0.046)	0.734 (0)	1			
Osteoid lines (no.)	0.35 (0.03)	0.562 (0)	0.544 (0)	0.628 (0)	1		
ABB particles (%)	-0.247 (0.133)	0.296 (0.071)	-0.243 (0.141)	-0.192 (0.247)	0.509 (0.001)	1	
Non-mineralized tissue (%)	0.329 (0.043)	-0.349 (0.031)	0.023 (0.889)	-0.076 (0.649)	-0.414 (0.009)	-0.613 (0)	1

*Pearson's coefficient (*r*) (bilateral signification).

ABB, anorganic bovine bone.

Cordaro et al. 2008). This may explain the previously reported higher success rates of implants inserted into grafted sinuses (Olsson et al. 2000; Scarano et al. 2006).

Our group has advocated for a surgical approach in which cortical AB is obtained from the lateral wall of the sinus cavity using a bone scraper, and then combined with a xenogenic bone substitute (e.g., ABB) (Galindo-Moreno et al. 2007; Martos Diaz et al. 2007). This approach not only allows to harvest AB to be used as a part of the grafting material, but also eliminates the need for a second surgical site to harvest autogenous bone. Despite AB being regarded as the gold standard in bone grafting material, it undergoes a rapid resorption when compared with other grafting materials. This resorption can be as much as 60% when it is used as a single biomaterial (Jensen & Sindet-Pedersen 1991). In this sense, Schlegel and collaborators observed that AB may be resorbed up to 40% after 6 months of healing when used as a sinus grafting material. They also found a lower bone-to-implant contact for implants placed in areas where AB was used vs. ABB: 42% vs. 68%, respectively (Schlegel et al. 2003). Hence, the combination of xenogenic and autologous bone may provide some benefits when compared with the sole use of AB. These include unlimited ABB availability, allowing recolonization and apposition of osteogenic cells, and a slow resorption rate (Piattelli et al. 1999; Taylor et al. 2002). Although it has not been fully elucidated what is the average amount of resorption in a determined time span, it has been shown that ABB particles may be present even 9 years after grafting (Traini et al. 2007). Our results showed a mean percentage of remaining ABB particle of 37.01% after 6 months of healing. This supports the notion of a slow resorption rate. ABB is an adequate scaffold for dimensional graft maintenance, a concept that is reinforced by the findings of this study, because the higher the proportion of ABB, the lower the total mean resorption of the

graft. Stratified data analysis of ABB percentage present in our samples showed that, above 30% of the remaining xenogenic particle, graft resorption was significantly lower (0.21 ± 0.1 mm vs. 0.42 ± 0.13 mm, $P = 0$ Welch's test). We assume that a slow degradation of the material occurs and not a complete replacement by AB in < 5 months after grafting, as reported by Tadjoeidin et al. (2003). In addition, the composite grafting material proposed here promotes an early osteogenesis/osteoinduction elicited by the cells and growth factors of the AB, which may in turn allow for a more efficient implant osseointegration (Tadjoeidin et al. 2003).

Newly formed bone showed slightly more osteoblasts (mean $\#/mm^2 = 267.3$), more osteoid lines ($P < 0.46$ Welch's test), significantly more osteoclasts (mean $\#/mm^2 = 151.1$), and a higher proportion of osteocytes (four times higher than osteoblasts), but less than mature pristine bone ($P < 0.0006$, Welch's test). A direct, statistically significant correlation found between the number of osteoblasts and the quantity of non-mineralized tissue supports the observations of Zerbo et al. (2005), who showed that early differentiation towards preosteoblastic undifferentiated cells may be mediated by the expression of Run $\times 2$, sialoprotein, and osteopontin.

On the other hand, the remaining ABB particle proportion seemed to be important for osteoid formation ($r = 0.509$, $P = 0.001$), as a significant increase of osteoid lines was observed when the ABB proportion was > 30% (19.32 ± 9.01 vs. 12.69 ± 12.22 , $P = 0.012$, Welch's test). This finding may be explained by the osteoconductive nature of ABB (Schlegel et al. 2003). Ultrastructural analysis revealed that the remaining ABB particles were surrounded by newly formed mature bone, throughout all the samples. Cement lines could be clearly identified, in the absence of gaps or fibrous interfaces. In the light of the findings of this study, we can state that ABB shows a different behavior from other bone substi-

tutes, such as tricalcium phosphate (Wiltfang et al. 2003; Zerbo et al. 2004), being attributable to its high osteoconductivity. However, we should not forget that, when no perforation is present, the sinus cavity is a self-contained defect. This promotes space maintenance and graft stability, and allows cell migration and continuous blood supply from all the bony walls, which results in favorable healing conditions.

Conclusions

We consider that sinus grafting constitutes an excellent model for the study of *de novo* bone formation patterns and graft consolidation when a combination of different bone substitutes is applied. In this study, we propose the use of a composite graft, consisting of AB and ABB. The results obtained are highly satisfactory from both a clinical and a histologic perspective. However, many questions remain unanswered with regard to this exciting field. For instance, why the non-mineralized tissue present in our samples determines the newly formed vital bone cellularity and how the quantity of ABB prevents the resorption.

Acknowledgements: We would like to acknowledge the contribution of María Dolores Rodríguez, Jorge A. Payá, and Mohamed Tassi, technicians at the Department of Pathology and IBIMER, as well as Dr Luna for his special contribution in the statistical analysis. This research project was partially supported by research group grants #CTS-138 and #CTS 583 (Junta de Andalucía, Spain).

Disclosure: All the authors claim to have no financial interest, either directly or indirectly, in any company or any of the products mentioned in this manuscript.

Disclaimers: The authors do not have any financial interests, either directly or indirectly, in the products listed in the study.

References

- Aparicio, C., Perales, P. & Rangert, B. (2001) Tilted implants as an alternative to maxillary sinus grafting: a clinical, radiologic, and periosteal study. *Clinical Implant & Dental Related Research* 3: 39–49.
- Artzi, Z., Weinreb, M., Carmeli, G., Lev-Dor, R., Dard, M. & Nemcovsky, C.E. (2008) Histomorphometric assessment of bone formation in sinus augmentation utilizing a combination of autogenous and hydroxyapatite/biphasic tricalcium phosphate graft materials: at 6 and 9 months in humans. *Clinical Oral Implants Research* 19: 686–692.
- Block, M.S. & Kent, J.N. (1997) Sinus augmentation for dental implants: the use of autogenous

- bone. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 55: 1281–1286.
- Boyne, P.J. & James, R.A. (1980) Grafting of the maxillary sinus floor with autogenous marrow and bone. *Journal of Oral Surgery* 38: 613–616.
- Cordaro, L., Bosshardt, D.D., Palattella, P., Rao, W., Serino, G. & Chiapasco, M. (2008) Maxillary sinus grafting with bio-oss or straumann bone ceramic: histomorphometric results from a randomized controlled multicenter clinical trial. *Clinical Oral Implants Research* 19: 796–803.
- Froum, S.J., Wallace, S.S., Cho, S.C., Elian, N. & Tarnow, D.P. (2008) Histomorphometric comparison of a biphasic bone ceramic to anorganic bovine bone for sinus augmentation: 6- to 8-month postsurgical assessment of vital bone formation. A pilot study. *International Journal of Periodontics and Restorative Dentistry* 28: 273–281.
- Galindo-Moreno, P., Avila, G., Fernandez-Barbero, J.E., Aguilar, M., Sanchez-Fernandez, E., Cuetando, A. & Wang, H.L. (2007) Evaluation of sinus floor elevation using a composite bone graft mixture. *Clinical Oral Implants Research* 18: 376–382.
- Galindo-Moreno, P., Avila, G., Fernandez-Barbero, J.E., Mesa, F., O'Valle-Ravassa, F. & Wang, H.L. (2008) Clinical and histologic comparison of two different composite grafts for sinus augmentation: a pilot clinical trial. *Clinical Oral Implants Research* 19: 755–759.
- Hallman, M., Sennerby, L. & Lundgren, S. (2002) A clinical and histologic evaluation of implant integration in the posterior maxilla after sinus floor augmentation with autogenous bone, bovine hydroxyapatite, or a 20:80 mixture. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* 17: 635–643.
- Jensen, J. & Sindet-Pedersen, S. (1991) Autogenous mandibular bone grafts and osseointegrated implants for reconstruction of the severely atrophied maxilla: a preliminary report. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 49: 1277–1287.
- Martos Diaz, P., Naval Gias, L., Sastre Perez, J., Gonzalez Garcia, R., Bances del Castillo, F., Mancha de la Plata, M., Galindo Moreno, P. & Munoz Guerra, M. (2007) Sinus elevation by *in situ* utilization of bone scrapers: technique and results. *Medicina Oral Patologia Oral y Cirugia Bucal* 12: E537–E541.
- Morand, M. & Irinakis, T. (2007) The challenge of implant therapy in the posterior maxilla: providing a rationale for the use of short implants. *Journal of Oral Implantology* 33: 257–266.
- Olson, J.W., Dent, C.D., Morris, H.F. & Ochi, S. (2000) Long-term assessment (5 to 71 months) of endosseous dental implants placed in the augmented maxillary sinus. *Annals of Periodontology* 5: 152–156.
- Piattelli, M., Favero, G.A., Scarano, A., Orsini, G. & Piattelli, A. (1999) Bone reactions to anorganic bovine bone (bio-oss) used in sinus augmentation procedures: a histologic long-term report of 20 cases in humans. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* 14: 835–840.
- Scarano, A., Degidi, M., Iezzi, G., Pecora, G., Piattelli, M., Orsini, G., Caputi, S., Perrotti, V., Mangano, C. & Piattelli, A. (2006) Maxillary sinus augmentation with different biomaterials: a comparative histologic and histomorphometric study in man. *Implant Dentistry* 15: 197–207.
- Schlegel, K.A., Fichtner, G., Schultze-Mosgau, S. & Wiltfang, J. (2003) Histologic findings in sinus augmentation with autogenous bone chips versus a bovine bone substitute. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* 18: 53–58.
- Schuklenk, U. & Ashcroft, R. (2000) International research ethics. *Bioethics* 14: 158–172.
- Simunek, A., Kopecka, D., Somanathan, R.V., Pilathadka, S. & Brazda, T. (2008) Deproteinized bovine bone versus beta-tricalcium phosphate in sinus augmentation surgery: a comparative histologic and histomorphometric study. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* 23: 935–942.
- Summers, R.B. (1998) Sinus floor elevation with osteotomes. *Journal of Esthetic Dentistry* 10: 164–171.
- Tadjoedin, E.S., de Lange, G.L., Bronckers, A.L., Lyaruu, D.M. & Burger, E.H. (2003) Deproteinized cancellous bovine bone (bio-oss) as bone substitute for sinus floor elevation. A retrospective, histomorphometrical study of five cases. *Journal of Clinical Periodontology* 30: 261–270.
- Tatum, H. Jr (1986) Maxillary and sinus implant reconstructions. *Dental Clinics of North America* 30: 207–229.
- Taylor, J.C., Cuff, S.E., Leger, J.P., Morra, A. & Anderson, G.I. (2002) In vitro osteoclast resorption of bone substitute biomaterials used for implant site augmentation: a pilot study. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* 17: 321–330.
- Traini, T., Valentini, P., Iezzi, G. & Piattelli, A. (2007) A histologic and histomorphometric evaluation of anorganic bovine bone retrieved 9 years after a sinus augmentation procedure. *Journal of Periodontology* 78: 955–961.
- Trisi, P. & Rao, W. (1999) Bone classification: clinical-histomorphometric comparison. *Clinical Oral Implants Research* 10: 1–7.
- Turkyilmaz, I. (2008) Influence of bone density on implant stability parameters and implant success: a retrospective clinical study. *BMC Oral Health* 8: 32.
- Turkyilmaz, I., Tumer, C., Ozbek, E.N. & Tozum, T.F. (2007) Relations between the bone density values from computerized tomography, and implant stability parameters: a clinical study of 230 regular platform implants. *Journal of Clinical Periodontology* 34: 716–722.
- Ulm, C., Kneissel, M., Schedle, A., Solar, P., Matejka, M., Schneider, B. & Donath, K. (1999) Characteristic features of trabecular bone in edentulous maxillae. *Clinical Oral Implants Research* 10: 459–467.
- Wallace, S.S., Froum, S.J. & Tarnow, D.P. (1996) Histologic evaluation of a sinus elevation procedure: a clinical report. *International Journal of Periodontics and Restorative Dentistry* 16: 46–51.
- Wallace, S.S. & Froum, S.J. (2003) Effect of maxillary sinus augmentation on the survival of endosseous dental implants. A systematic review. *Annals of Periodontology* 8: 328–343.
- Wiltfang, J., Schlegel, K.A., Schultze-Mosgau, S., Nkenke, E., Zimmermann, R. & Kessler, P. (2003) Sinus floor augmentation with beta-tricalciumphosphate (beta-tcp): does platelet-rich plasma promote its osseous integration and degradation? *Clinical Oral Implants Research* 14: 213–218.
- Yildirim, M., Spiekermann, H., Biesterfeld, S. & Edelhoff, D. (2000) Maxillary sinus augmentation using xenogenic bone substitute material bio-oss in combination with venous blood. A histologic and histomorphometric study in humans. *Clinical Oral Implants Research* 11: 217–229.
- Yildirim, M., Spiekermann, H., Handt, S. & Edelhoff, D. (2001) Maxillary sinus augmentation with the xenograft bio-oss and autogenous intraoral bone for qualitative improvement of the implant site: a histologic and histomorphometric clinical study in humans. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* 16: 23–33.
- Zerbo, I.R., Bronckers, A.L., de Lange, G. & Burger, E.H. (2005) Localisation of osteogenic and osteoclastic cells in porous beta-tricalcium phosphate particles used for human maxillary sinus floor elevation. *Biomaterials* 26: 1445–1451.
- Zerbo, I.R., Zijdeveld, S.A., de Boer, A., Bronckers, A.L., de Lange, G., ten Bruggenkate, C.M. & Burger, E.H. (2004) Histomorphometry of human sinus floor augmentation using a porous beta-tricalcium phosphate: a prospective study. *Clinical Oral Implants Research* 15: 724–732.
- Zinner, I.D. & Small, S.A. (2004) Maxillary sinus grafts and prosthetic management. In: Zinner, I.D. & Panno, V., eds. *Implants Dentistry: From Failure to Success*. 1st edition, 99–100. Hong Kong: Quintessence Books.

Pablo Galindo-Moreno
 Ildefonso Moreno-Riestra
 Gustavo Avila
 Miguel Padiál-Molina
 Jorge A. Paya
 Hom-Lay Wang
 Francisco O'Valle

Effect of anorganic bovine bone to autogenous cortical bone ratio upon bone remodeling patterns following maxillary sinus augmentation

Authors' affiliations:

Pablo Galindo-Moreno, Oral Surgery and Implant Dentistry Department, School of Dentistry, University of Granada, Granada, Spain

Pablo Galindo-Moreno, Ildefonso Moreno-Riestra, Miguel Padiál-Molina, Gustavo Avila, Hom-Lay Wang, Department of Periodontics and Oral Medicine, School of Dentistry, University of Michigan, Ann Arbor, MI, USA

Jorge A. Paya, Francisco O'Valle, Department of Pathology and IBIMER, School of Medicine, University of Granada, Granada, Spain

Corresponding author:

Pablo Galindo-Moreno
 C/Recogidas, 39 5° Izq
 18005 Granada
 Spain

Tel.: +34 958 520658

Fax: +34 958 520658

e-mail: pgalindo@ugr.es/pablogm@umich.edu

Key words: bone grafting, bone remodeling, dental implants, maxillary sinus, osteopontin, TRAP-1 protein

Abstract

Introduction: Maxillary sinus augmentation is a predictable implant site development technique, although several local and systemic factors may influence outcomes. The aim of this study was to evaluate healing patterns and bone remodeling activity following the use of two different graft mixtures for maxillary sinus augmentation.

Materials and methods: Patients in need of maxillary sinus augmentation were randomly assigned to two different groups. A graft mixture using a 50% autologous bone (AB) to 50% anorganic bovine bone (ABB) ratio was used in group 1, while a 20% AB to 80% ABB ratio was utilized for group 2. After a 6-month healing period, bone core biopsies were harvested for histological, histomorphometrical, and immunohistochemical analyses.

Results: Twenty-eight subjects participated in this study. No statistically significant differences were found between groups in regards to vital bone and non-mineralized tissue proportions. Higher number of osteoid lines (18.05 ± 10.06 in group 1 vs. 9.01 ± 7.53 in group 2; $P=0.023$) and higher cellularity, particularly regarding the number of osteocytes (631.85 ± 607.98 in group 1 vs. 219.08 ± 103.26 in group 2; $P=0.002$), were observed in specimens from group 1. Differences in expression patterns of osteopontin and tartrate-resistant acid phosphatase were also detected between groups.

Conclusion: AB to ABB ratio appears to influence bone remodeling patterns and cell content following maxillary sinus augmentation procedures. Similar proportion of vital bone was found in specimens obtained from both groups. More cellular presence was observed in samples containing higher proportions of AB.

Since the introduction of maxillary sinus augmentation as an implant site development modality (Boyne & James 1980), several modifications of the lateral approach technique have been developed (Vercellotti et al. 2001; Lundgren et al. 2004; Peleg et al. 2004; Soltan & Smiler 2005; Martos Diaz et al. 2007). Likewise, a variety of materials (i.e. autografts, allografts, alloplasts, and xenografts) have been applied for sinus grafting, typically associated with satisfactory clinical outcomes (Wheeler 1997; Wallace & Froum 2003; Del Fabbro et al. 2004). According to the current understanding, there is no evidence supporting the superiority of any particular bone graft in terms of implant survival or absence of complications at the recipient site (Browaeys et al. 2007; Nkenke & Stelzle 2009). In light of this information, many clinicians have accepted as a general consensus the concept that maxillary

sinus augmentation is predictable, regardless of the grafting material used. However, it is important to keep in mind that long-term clinical success relies on the formation of a functional vital bone-graft complex, which is influenced by the type of graft used (Watzek et al. 2006).

Autologous bone (AB) and anorganic bovine bone (ABB) are the biomaterials with the strongest literature support in sinus augmentation. It is a general belief that AB is the gold standard bone grafting material, given its unique osteoconductive, osteoinductive, and osteogenic properties. However, intense bone remodeling leading to excessive bone resorption may occur when AB is used as a sole material for sinus augmentation (Schlegel et al. 2003). In order to prevent this unfavorable event, its use in combination with a slowly absorbable material has been proposed (Yildirim et al. 2001; Hallman et al. 2002b).

Date:

Accepted 19 August 2010

To cite this article:

Galindo-Moreno P, Moreno-Riestra I, Avila G, Padiál-Molina M, Paya JA, Wang H-L, O'Valle F. Effect of anorganic bovine bone to autogenous cortical bone ratio upon bone remodeling patterns following maxillary sinus augmentation. *Clin. Oral Impl. Res.* 22, 2011; 857–864.
 doi: 10.1111/j.1600-0501.2010.02073.x

ABB presents a notable slow resorption rate, being able to remain stable for years (Sartori et al. 2003; Traini et al. 2007). Furthermore, ABB possesses remarkable osteoconductivity, as well as an ability to allow revascularization (Galindo-Moreno et al. 2010b). Previous studies have reported the histologic features of bone samples obtained after the utilization of AB (Hallman et al. 2002b), ABB (Ferreira et al. 2009), or a combination of them (Wallace et al. 2005; Galindo-Moreno et al. 2007). Interestingly, tissues analyzed present different characteristics depending on the nature of the grafting material applied, the proportion of materials used, and the time of sample harvesting. Therefore, some critical questions remain unanswered.

Within the limits of our knowledge, there is a paucity of controlled studies aimed at evaluating sinus augmentation outcomes at the histological level, depending on the AB to ABB ratio in a large series of patients. Hence, the objective of the present study was to evaluate tissue response and bone remodeling activity in samples obtained after using two different graft mixture ratios for maxillary sinus augmentation.

Material and methods

Study design and subject recruitment

Before subject recruitment, this prospective clinical trial was reviewed and approved by the Institutional Review Board of the University of Granada. The study was conducted according to the principles of the Helsinki's declaration for experimentation involving human subjects (Schuklenk & Ashcroft 2000).

Totally or partially edentulous patients in need of maxillary sinus augmentation were screened and included in the study according to the following inclusion criteria: Adult patients (18–85 years of age) presenting a physical status according to the American Society of Anesthesiologists of I or II (<http://www.asahq.org/clinical/physical-status.htm>), no uncontrolled systemic disease, no condition known to alter bone metabolism (i.e. osteoporosis, diabetes mellitus), O'Leary plaque score $\leq 20\%$ (O'Leary et al. 1972), and ≤ 5 mm of remaining bone height based on radiographic measurements over panoramic films (Wang & Katranji 2008; Rios et al. 2009). Subjects who reported antibiotic intake within 3 months before study initiation, or long-term use (>6 months) of medications known to modify bone metabolism (such as bisphosphonates and corticosteroids), women that were pregnant or attempting to get pregnant at the time of the screening, and patients that presented untreated chronic sinus conditions (i.e. cysts, tumors), sepsis, history of cancer and/or radiation to the

oral cavity, or complications derived from any of these conditions affecting the sinus area, were excluded from the study. Patients who reported smoking >10 cigarettes per day (Levin et al. 2004), and consumers of >10 g of alcohol per day (Galindo-Moreno et al. 2005) were also excluded. For the statistical analysis, patients who reported smoking one or more cigarettes per day or consuming one or more alcohol-containing drinks daily were accounted as smokers and alcohol consumers, respectively. Patients who met the inclusion and exclusion criteria were required to read, understand, and sign an informed consent before the final enrollment in the clinical trial.

Surgical procedures

Patients were requested to take an antibiotic (Amoxicillin/Clavulanate 875/125 mg t.i.d. for 10 days, starting 2 days before the surgery; or Clindamycin 300 mg t.i.d. for 10 days, starting 2 days before the surgery, in case of allergy to penicillins) to minimize the risk of infection. All surgical procedures were performed under local anesthesia (Articain, Ultracain[®], Aventis Inc., Frankfurt, Germany). Sinus were intervened following the technique proposed by Galindo-Moreno et al. (2007), using a bone scraper (Safe-scraper[®], Meta, Reggio Emilia, Italy) to harvest AB from the lateral wall and expose the Schneiderian membrane. Following membrane elevation, sinus cavities were grafted with AB in combination with ABB particles ranging from 250 to 1000 μm (Geistlich Bio-Oss[®], Geistlich Pharma AG, Wolhusen, Switzerland). Two different mixtures were used, consisting of a 50% [AB]:50% [ABB] ratio (group 1) and a 20% [AB]:80% [ABB] ratio (group 2), reported previously as an ideal composite proportion for maxillary sinus augmentation procedures (Hallman et al. 2002b). As much graft volume as necessary was used to meet the clinical goal, to a maximum of 5 cm^3 of material per sinus cavity (Galindo-Moreno et al. 2008). After bone grafting, an absorbable collagen membrane (Geistlich Bio-Gide[®], Geistlich Pharma AG) was placed over the lateral aspect of the bony window. Then, flaps were carefully approximated and sutured with surgical silk 3/0 (Laboratorio Aragón, Barcelona, Spain), attempting primary closure.

After a healing period of 6 months, a 3 mm internal, 4 mm external diameter trephine was used to harvest bone core biopsies from the alveolar crest where implants were prosthetically planned. Implants (Osseospeed[™], Astra Tech, Mölndal, Sweden) were placed in a submerged approach. Dental implants were delivered only if primary stability was attained (32 N/cm^2 of insertion torque). If implant primary stabilization could not be achieved during implant placement,

the standard of care was applied: Either placement of a larger (wider, longer, or both) implant in order to achieve stability or abort implant placement at that time, grafting the area (Geistlich Bio-Oss[®], Geistlich Pharma AG), and allow further healing for an additional period of time (at least 3 months).

Radiographic evaluation

Standardized digital panoramic X-rays (Kodak ACR-2000, Eastman Kodak Company, Rochester, NY, USA) were obtained at the time of implant placement and 24 months after functional loading in all cases.

A masked examiner (M. P.-M.) measured the distance from the alveolar crest to the most apical part of the graft, using specialized software (Dent-A-View V 1.0, DigiDent, DIT, Neshet, Israel).

Histological and histomorphometrical analyses

Immediately after harvesting, bone core biopsies were fixed in 10% buffered formalin for 24 h. Then, samples were decalcified (Decalcifier 1[®], Surgipath Europe Ltd, Peterborough, UK) containing formaldehyde (10% w/v), formic acid (8% w/v), and methanol (1% w/v) for >20 days, and embedded in paraffin. Bone biopsies were dewaxed, hydrated, and sectioned ($\sim 4 \mu\text{m}$) along the central axis of the core. Sections were processed for hematoxylin-eosin (H-E), teriodic acid Schiff, Masson trichrome, and Goldner trichrome staining. A millimeter scale in the eyepiece of a microscope (BH2, Olympus Optical Company Ltd, Tokyo, Japan) with a $\times 40$ objective was used to count osteoblasts, osteoclasts, and osteocytes per mm^2 . The results were expressed as the mean number of positive cells per mm^2 . Bone histomorphometric analyses were performed semi-automatically using Masson trichrome-stained sections. Ten randomized images per sample were captured with a microscope equipped with a $\times 10$ objective and a digital camera (DP70, Olympus Optical Company Ltd), connected to a computer containing specialized software to perform histomorphometric analysis (ImageJ, NIH, Bethesda, MD, USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Vital bone, remaining ABB particle, and non-mineralized tissue proportions were quantified separately. The results were expressed as percentages. Bone formation was assessed as a function of the number of osteoid lines in the total core biopsies length.

Immunohistochemical analysis

Decalcified and paraffin-embedded sections were dewaxed, hydrated, and heat treated in 1 mM EDTA buffer for antigenic unmasking in a PT module (Thermo Fisher Scientific, Fremont, CA, USA) at 95°C during 20 min. Sections were

incubated for 60 min at room temperature with prediluted Osteopontin (OPN), and BMP-4 polyclonal antibodies to identify cellular and interstitial expression, and prediluted monoclonal antibodies CD56 [Clone 56Co4/123A8] to identify osteoblastic cells, tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP-1) [Clone 26E5] to identify osteoclast cells and CD68 [Clone KP1] to identify monocytes/macrophages cells, and vimentin [Clone V9] to identify mesenchymal cells (positive control). All antibodies were purchased from the same company (Master Diagnóstica, Granada, Spain). Immunohistochemical analysis was performed utilizing an automatic immunostainer (Autostainer 480, Thermo Fisher Scientific) using the polymer-peroxidase-based method, followed by development with diaminobenzidine (Master Diagnóstica). A millimeter scale in the eyepiece of a microscope (BH2, Olympus Optical Company Ltd) with a $\times 40$ objective was used to count positive cells per mm^2 . Histological, histomorphometrical, and immunohistochemical analyses were conducted by an experienced, masked examiner (F.O.).

Statistical analysis

Following the descriptive analysis, the χ^2 test (for gender, smokers, alcohol consumption, and type of edentulism), and the Mann-Whitney *U*-test (for determining significant differences between treatment groups) were applied; a *P*-value < 0.05 was considered to be statistically significant. Statistical analyses were performed using statistical analysis software (SPSS-Windows 15.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

Results

Study population

A total of 28 subjects (18 males and 10 females), with a mean age of 47.3 ± 9.8 (ranging from 30 to 72 years), participated in the study. In our series, 28.57% of the study population was totally edentulous, 71.42% of the patients were smokers and 7.14% were alcohol consumers.

Patients were randomly assigned to the two groups ($n = 14$ each), in order to account for these demographical features. Hence, no statistically significant difference among groups existed at baseline, as reflected in Table 1. No major complication was recorded in any case. All patients completed the study.

Radiographic findings

Analysis of the differences between measurements demonstrated statistically significant increased bone resorption in patients from group 2 (0.27 ± 0.12 mm in group 1 vs. 0.43 ± 0.7 mm in group 2; $P = 0.033$ Mann-Whitney *U*-test).

Table 1. Study population characteristics

Variables	Group 1 50% [AB]: 50% [ABB]	Group 2 20% [AB]: 80% [ABB]	<i>P</i> -values χ^2 Inter-groups	<i>P</i> -values χ^2 intra-groups
Age	49.1	43.3	$P = 0.155^*$	–
Gender (male/female)	9/5	9/5	0.769	0.144
Smoker (yes/no)	12/2	8/6	0.376	0.22
Alcohol consumer (yes/no)	1/13	1/13	0.671	0.001
Totally edentulous (yes/no)	3/11	4/10	0.922	0.022

*Mann-Whitney *U*-test.
AB, autologous bone; ABB, anorganic bovine bone particles.

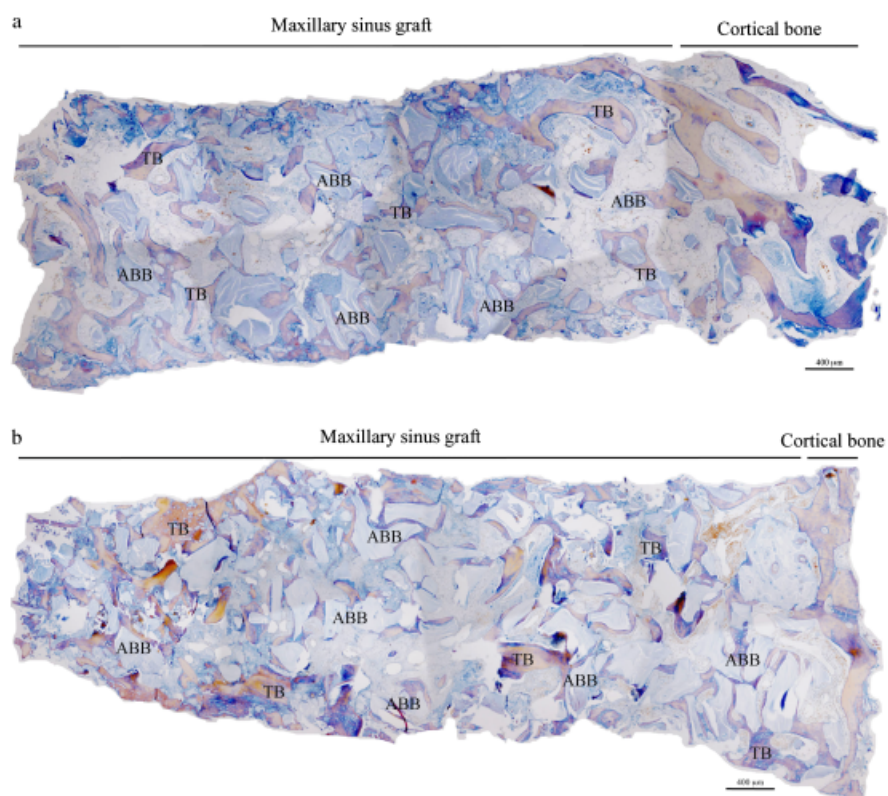


Fig. 1. Comparative trephine biopsies from maxillary sinus augmentation of group 1 (a), and group 2 (b). ABB, anorganic bovine bone particles; TB, trabecular bone. Scale bar 400 μm (Masson trichrome).

Histological and histomorphometrical analyses

All biopsy samples presented similar dimensions, ranging from 13 to 15 mm of length (Fig. 1). Histomorphometric analysis of group 1 samples revealed that the mean proportion of vital bone was $36 \pm 9.44\%$, average proportion of non-mineralized tissue was $44.8 \pm 13.51\%$, and $19.36 \pm 14.58\%$ was the mean value for remaining ABB particles. Mean numbers of osteoblasts and osteoclasts found per mm^2 were 160.11 ± 220.89 and 106.38 ± 173.11 , respectively. Interestingly, mean osteocyte count per mm^2 was 631.85 ± 607.98 . On the other hand, analysis of samples obtained from group 2 revealed that the mean proportion of vital bone was $37.38 \pm 17.46\%$, the mean percentage of non-mineralized tissue content was $31.92 \pm 16.05\%$, and aver-

age proportion of remaining ABB particles was $30.75 \pm 18.51\%$. Mean numbers of osteoblasts and osteoclasts found per mm^2 were 75.27 ± 58.89 and 50.41 ± 33.87 , respectively. Mean value after osteocyte count was 219.08 ± 103.26 . No significant differences between groups were observed in relation to vital bone, and non-mineralized tissue (Table 2). While tissue compartments values did not show statistically significant differences between both graft mixtures, osteoid lines were significantly more abundant in the composite with higher quantity of vital bone (18.05 ± 10.06 in group 1 vs. 9.01 ± 7.53 in group 2; $P = 0.023$, Mann-Whitney *U*-test) (Fig. 2). Similarly, group 1 samples exhibited more cellular presence in all analyzed parameters as compared with group 2 specimens

(Table 2). Nonetheless differences were statistically significant only regarding the number of osteocytes per mm^2 ($P=0.002$, Mann–Whitney *U*-test).

Immunohistochemical analysis

Interestingly, no statistically significant difference between groups with regard to the expression of any of the immunohistochemical markers tested in this study (CD56, TRAP-1, CD68, and BMP-4) was observed. Regarding TRAP-1 expression, we found the presence of a higher number of osteoclasts per mm^2 (TRAP-1 positive) in group 2 samples (86.58 ± 61.81 vs. 109.96 ± 62.38 , $P=0.25$). Furthermore, a higher number of osteoclasts per ABB particles as identified in samples from group 2 (1.52 ± 1.5 vs. 2.59 ± 1.5 , $P=0.06$) predominantly surrounding ABB particles (Fig. 3). CD68 expression in osteoclasts cells was similar in both groups (Fig. 4). BMP-4 was expressed in some osteocytes of vital bone (cortical and trabecular), osteoclasts, and osteoblasts for both groups, but not in all cases (Fig. 5). OPN was expressed in vital bone (cortical and trabecular) and in the cement lines between remaining ABB particles and vital bone, particularly in samples from group 1, and significant differences were observed among groups (0.68 ± 0.25 in group 1 vs. 0.1 ± 0.31 , in group 2; $P=0.013$, Mann–Whitney *U*-test). A clear OPN expression was observed in osteocytes present in vital bone in group 1 specimens (Fig. 6). On the other hand, a robust expression of OPN- and TRAP-1-positive cells was observed in the surface of ABB particles in specimens from group 2 (Figs 3 and 6).

Discussion

One of the critical aspects of any bone grafting procedure is the selection of the biomaterial, considering the goal of the intervention, individual patient features, anatomic location, defect morphology, and the properties of the material itself. ABB has been regarded as an excellent biomaterial for sinus augmentation given its osteoconductive properties (Hallman et al. 2002a), structural stability (Schlegel et al. 2003), and long-term positive clinical response (Mayfield et al. 2001). However, this biomaterial does not have the capacity to interact with titanium to promote osseointegration (Valentini et al. 1998; Rosenlicht & Tamow 1999). Theoretically, this could imply that grafts containing elevated proportions of ABB may not be adequate to achieve an optimal bone-to-implant contact (Haas et al. 1998). Smiler et al. (1992) reported that bone formation was faster using a composite graft of ABB granules and AB than with the application of ABB as a sole grafting material. In a different study,

Table 2. Comparison of morphometrical variables between groups

Morphometric variables	Group 1 50% [AB]: 50% [ABB]	Group 2 20% [AB]: 80% [ABB]	<i>P</i> -values*
Vital bone (%)	36 ± 9.44	37.38 ± 17.46	0.114
ABB particles (%)	19.36 ± 14.58	30.75 ± 18.51	0.013
Non-mineralized tissue (%)	44.8 ± 13.51	31.92 ± 16.05	0.324
Osteoblast cells (mm^2)	160.11 ± 220.89	75.27 ± 58.89	0.531
Osteoclast cells (mm^2)	106.38 ± 173.11	50.41 ± 33.87	0.327
Osteocytes (mm^2)	631.85 ± 607.98	219.08 ± 103.26	0.002
Osteoid lines	18.05 ± 10.06	9.01 ± 7.53	0.023

Values are expressed as mean ± standard deviation.
*Mann–Whitney *U*-test.
AB, autologous bone; ABB, anorganic bovine bone particles.

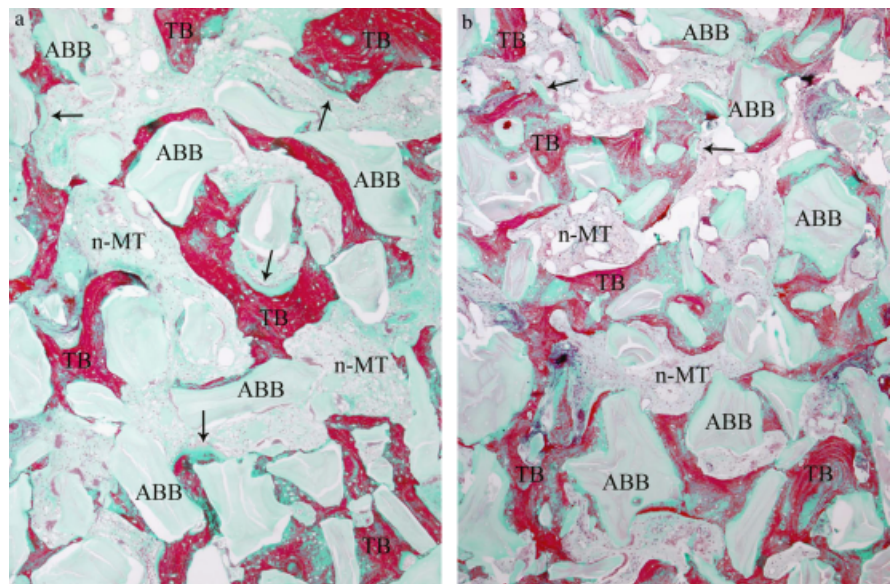


Fig. 2. Morphological features of composite maxillary sinus graft after 6 months. Note the numerous osteoid lines (arrows) in group 1 (50% [AB]: 50% [ABB] ratio) (a) in comparison with group 2 (20% [AB]: 80% [ABB] ratio) (b). ABB, anorganic bovine bone particles; TB, trabecular bone; n-MT, non-mineralized tissue (Masson trichrome × 40).

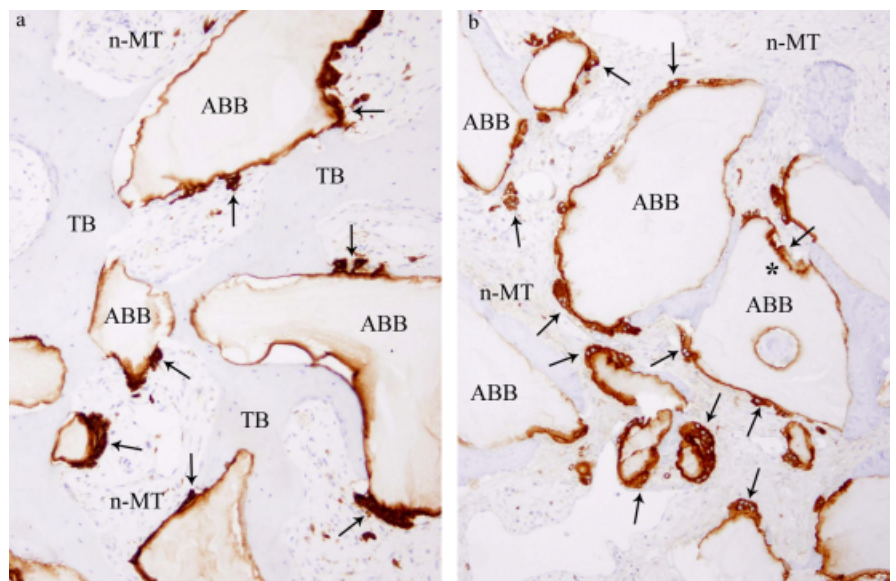


Fig. 3. Identification of osteoclasts cells (arrows) located principally around ABB particles by means of immunohistochemical tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP-1) expression. In group 1 (a), there are less than group 2 (b) osteoclasts cells per ABB particle and per millimeter square. Note TRAP-1 deposit in resorption edge of ABB particles (asterisk). ABB, anorganic bovine bone particles; TB, trabecular bone; n-MT, non-mineralized tissue (polymer-peroxidase-based method × 100).

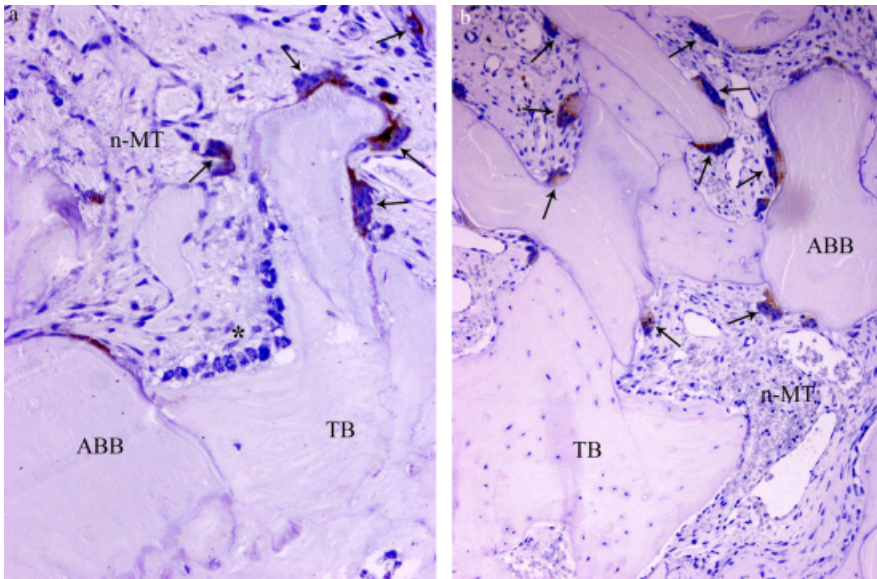


Fig. 4. CD68 expression in osteoclast cells (arrows). (a) Group 1 [50 : 50 AB to ABB ratio] (*osteoblast cells) (polymer-peroxidase-based method $\times 200$). (b) Group 2 [20 : 80 AB to ABB ratio] (polymer-peroxidase-based method $\times 100$). ABB, anorganic bovine bone particles; TB, trabecular bone; n-MT, non-mineralized tissue.

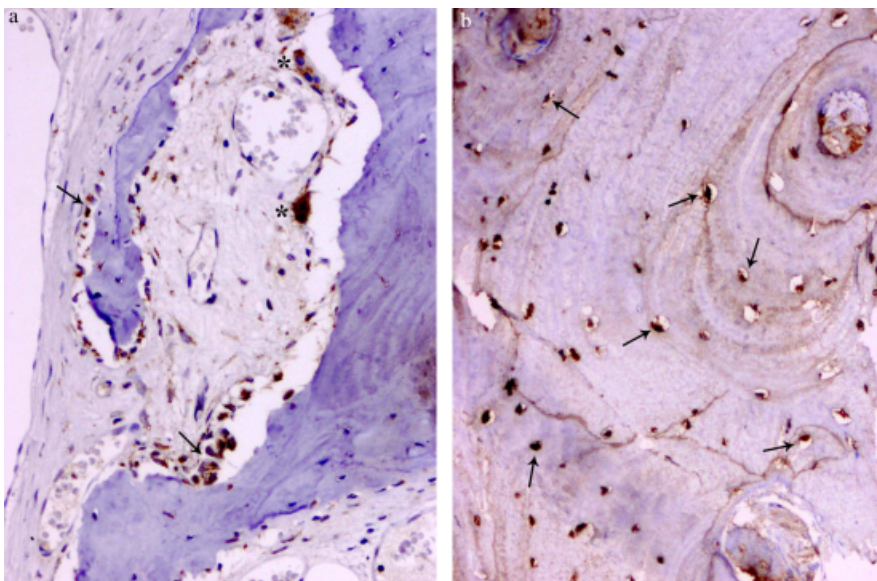


Fig. 5. BMP-4 expression. (a) Positives osteoblasts (arrows), and osteoclasts (asterisk). (b) Positives osteocytes (arrows) in cortical bone (polymer-peroxidase-based method $\times 200$).

Tadjoedin et al. (2003) compared different AB to ABB ratios in a human model and indicated that the final amount of vital bone formed during the healing period correlated inversely with the proportion of ABB particles present in the graft. However, a limitation of these studies was the low number of patients included. Thorwarth and colleagues evaluated graft maturation using either ABB alone or a composite of ABB and AB (75% to 25%, respectively) in an animal model. The addition of autogenous bone to ABB resulted in higher initial proportion of vital bone. It was concluded that 25% AB was an adequate proportion to induce

increased bone formation (Thorwarth et al. 2006). Interestingly, Hallman et al. (2002b) showed in a human study that among using AB, ABB, and a combination of them, the best results in terms of bone-to-implant contact and vital bone area were achieved when both biomaterials were combined in a 20% [AB]:80% [ABB] ratio.

The present study was conducted to determine if the use of two different AB to ABB ratios (50 : 50 or 20 : 80) may affect graft consolidation and bone remodeling after sinus augmentation. Bone core biopsies were harvested after a healing period of 6 months, at the time of implant

placement, in order to investigate the characteristics of these tissues. Analysis of the proportion of newly formed vital bone in human histological samples has been traditionally accepted as a valid method to evaluate sinus augmentation outcomes (Wallace et al. 1996). Other morphometrical and immunohistochemical parameters (i.e. osseous cells count, OPN and TRAP-1 expression) have also proven to be useful in assessing the bone remodeling response after the process of graft maturation (Galindo-Moreno et al. 2010a). Hence, vital bone, non-mineralized tissue, and remaining ABB particles proportion, as well as the number of osteoblasts, osteoclasts, osteocytes, osteoid lines, and the expression of several molecular markers were determined in our samples.

After histomorphometric analysis, similar mean vital bone proportion was observed for both groups. However, vital bone percentage was very slightly higher in samples containing a higher ABB proportion ($36 \pm 9.44\%$ vs. $37.38 \pm 17.46\%$). Our findings are in accordance with the data reported by Hallman et al. (2002b) [$37.7 \pm 31.3\%$ [100% AB]; $39.9 \pm 8\%$ [20% AB:80% ABB]; $41.7 \pm 26.6\%$ [100% ABB]]. This finding may be explained because ABB appear to act as a guidance to osteogenic cells from pre-existing bone surfaces of the sinus floor along the surface of the grafted ABB particles (Tadjoedin et al. 2003). Nevertheless, cell populations were found to be quite different in both graft mixtures. Osteoid lines were more abundant in the composite graft with higher quantity of AB. Likewise, more cellularity was observed in samples obtained from group 1 in comparison with specimens from group 2. This included all the cellular components analyzed (osteoblasts, osteoclasts, and osteocytes), although the difference was statistically significant only for the number of osteocytes. Our results suggest that bone metabolism may be more intense in grafts containing higher baseline vital bone proportions, as indicated by Smiler et al. (1992). This tissue response can be attributed to the presence of AB, which may act as a local source of cells and bone matrix proteins with osteoinductive properties (Thorwarth et al. 2006).

A remarkable finding in our study was the distribution of OPN. OPN is involved in a variety of biologic events, including cell-binding activity (Milam et al. 1991) and bone angiogenesis (Matusan-Ilijas et al. 2008). OPN is secreted not only by cells of the osteoblastic lineage (Zohar et al. 1997) but also by osteocytes (McKee & Nanci 1995; Sodek et al. 1995). In our samples, OPN was expressed markedly in osteocytes present in vital bone in specimens containing more AB (group 1). It is important to remember that a statistically significant difference in the number of osteocytes was observed between

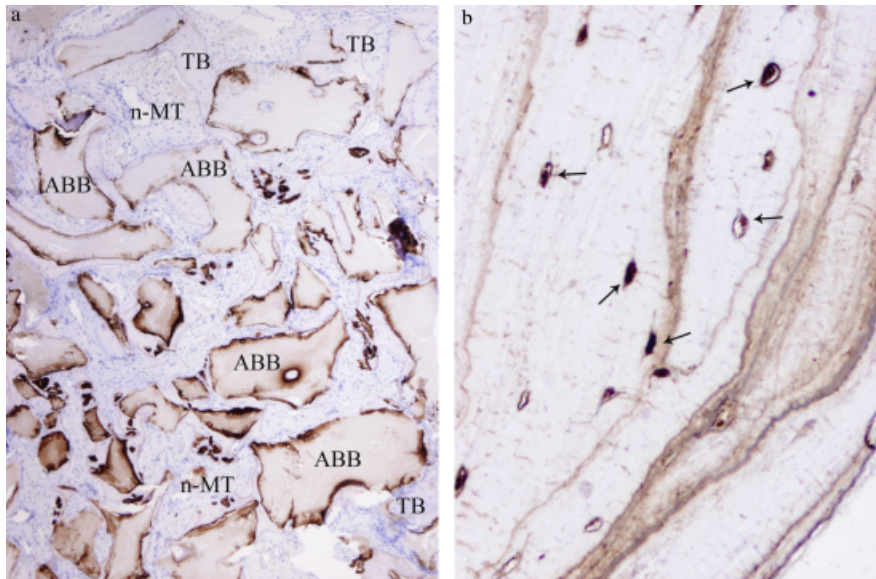


Fig. 6. Osteopontin (OPN) expression. (a) OPN deposits surrounding ABB particles in group 1 (dark lines) (polymer-peroxidase-based method $\times 40$). (b) OPN expression in osteocytes of trabecular bone (arrows) principally in group 1 (polymer-peroxidase-based method $\times 400$). ABB, anorganic bovine bone particles; TB, trabecular bone; n-MT, non-mineralized tissue.

groups in favor of group 1 ($P = 0.002$, Mann-Whitney U -test). Likewise, the mean number of osteoid lines was twice as much in the group with higher quantity of vital bone. Taking in consideration this information and the critical role that osteocytes play in orchestrating bone metabolism (Bonewald 2006), this distinctive pattern of OPN expression may indicate that osteocyte-derived OPN may be utilized in the cement line for osteoblast adhesion or to guide early calcification events at this junction (Ganss et al. 1999).

Interestingly, a marked expression of OPN on ABB particles was observed in samples from group 2. This distribution of OPN throughout the anorganic bone matrix may influence osteoclast activity during resorption and maturation of woven bone (Sodek et al. 2000). There is strong evidence supporting the role of OPN in the formation (Yamate et al. 1997), migration (Noda et al. 1998), attachment (Katayama et al. 1998), and regulation of the resorptive activity of osteoclasts (Duong & Rodan 1999). Understanding of the role of OPN as a regulator of bone remodeling is a very interesting topic because the mechanisms that govern the dual behavior of

OPN remain unclear, as this protein can regulate bone resorptive or osteogenic processes.

TRAP-1 protein is a specific marker for osteoclastic cells activity. The presence of a higher number of osteoclasts TRAP-1 positive per mm^2 was observed in group 2 samples. Furthermore, more osteoclasts per ABB particles were identified in samples from group 2 and predominantly surrounding ABB particles (Fig. 3); however, these differences were not statistically significant. Regarding these findings, Tadjoein et al. (2003) related the presence of many TRAP-positive multinucleated cells against the ABB granules, which may suggest that ABB granules were gradually degraded and resorbed by the activity of osteoclasts. Interestingly, in our study, TRAP-1-positive cell distribution showed a similar pattern to OPN expression. Osteoclast migration and attachment is determined by phosphorylated OPN, and this biological event is regulated by the endogenous TRAP-1 (Ek-Rylander & Andersson 2009). This finding confirms that OPN not only plays a major role in osteoclast activation but also facilitates osteoclast migration as suggested previously (Razzouk et al. 2002).

Similar patterns of OPN and TRAP-1 expression intra-groups but different patterns inter-groups, may indicate that the proportion of ABB directly influences the net resorption of this xenogenic material. Owing to its scaffolding properties and its low resorption index, ABB may contribute significantly to prevent volume loss in grafted areas. While some authors have indicated that ABB particles barely undergo resorption (Mordenfeld et al. 2010), our results from this and previous studies, as well as others reported by authors (Perrotti et al. 2009), contradict this concept. Results presented in this study show that the higher initial quantity of ABB particles, the more the OPN and TRAP-1 expression found in the remaining particles. However, in spite of comprising less cellularity, a greater number of osteoclasts expressing TRAP-1 over these particles (1.52 ± 1.5 vs. 2.59 ± 1.5 , $P = 0.06$) were observed in samples from group 2. Radiographic findings support this concept, given the increased average resorption observed in group 2.

Conclusions

AB to ABB ratio was found to influence bone remodeling patterns and cell content following sinus augmentation procedures. A similar proportion of vital bone was found in specimens obtained from both groups. However, more cellular activity was observed in samples containing more AB.

Acknowledgements: We would like to acknowledge Prof. Catena (School of Psychology, University of Granada), Prof. Francisco Mesa (School of Dentistry, University of Granada), Prof. Mercedes Gallas (School of Dentistry, University of Santiago de Compostela), María Dolores Rodríguez, and Mohamed Tassi, laboratory technicians at the Department of Pathology of the University of Granada and Institute of Biopathology and Regenerative Medicine (IBIMER), for their valuable contribution to this study.

Disclaimer: Authors declare having no conflict of interest, either directly or indirectly in any of the companies or products listed in the study. This investigation was partially supported in part by Research Group #CTS-138 and #CTS 583 (Junta de Andalucía, Spain).

References

- Bonewald, L. (2006) Osteocytes as multifunctional cells. *Journal of Musculoskeletal and Neuronal Interactions* 6: 331–333.
- Boyne, P.J. & James, R.A. (1980) Grafting of the maxillary sinus floor with autogenous marrow and bone. *Journal of Oral Surgery* 38: 613–616.
- Browaeys, H., Bouvry, P. & De Bruyn, H. (2007) A literature review on biomaterials in sinus augmentation procedures. *Clinical Implant Dentistry & Related Research* 9: 166–177.
- Del Fabbro, M., Testori, T., Francetti, L. & Weinstein, R. (2004) Systematic review of survival rates for implants placed in the grafted maxillary sinus. *The International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry* 24: 565–577.
- Duong, L.T. & Rodan, G.A. (1999) The role of integrins in osteoclast function. *Journal of Bone and Mineral Metabolism* 17: 1–6.

- Ek-Rylander, B. & Andersson, G. (2009) Osteoclast migration on phosphorylated osteopontin is regulated by endogenous tartrate-resistant acid phosphatase. *Experimental Cell Research* **316**: 443–465.
- Ferreira, C.E., Novaes, A.B., Haraszthy, V.I., Bittencourt, M., Martinelli, C.B. & Luczyszyn, S.M. (2009) A clinical study of 406 sinus augmentations with 100% anorganic bovine bone. *Journal of Periodontology* **80**: 1920–1927.
- Galindo-Moreno, P., Avila, G., Fernandez-Barbero, J.E., Aguilar, M., Sanchez-Fernandez, E., Cutando, A. & Wang, H.L. (2007) Evaluation of sinus floor elevation using a composite bone graft mixture. *Clinical Oral Implants Research* **18**: 376–382.
- Galindo-Moreno, P., Avila, G., Fernandez-Barbero, J.E., Mesa, F., O'Valle-Ravassa, F. & Wang, H.L. (2008) Clinical and histologic comparison of two different composite grafts for sinus augmentation: a pilot clinical trial. *Clinical Oral Implants Research* **19**: 755–759.
- Galindo-Moreno, P., Fauri, M., Avila-Ortiz, G., Fernandez-Barbero, J.E., Cabrera-Leon, A. & Sanchez-Fernandez, E. (2005) Influence of alcohol and tobacco habits on peri-implant marginal bone loss: a prospective study. *Clinical Oral Implants Research* **16**: 579–586.
- Galindo-Moreno, P., Moreno-Riestra, I., Avila, G., Fernandez-Barbero, J.E., Mesa, F., Aguilar, M., Wang, H.L. & O'Valle, F. (2010a) Histomorphometric comparison of maxillary pristine bone and composite bone graft biopsies obtained after sinus augmentation. *Clinical Oral Implants Research* **21**: 122–128.
- Galindo-Moreno, P., Padial-Molina, M., Fernandez-Barbero, J.E., Mesa, F., Rodriguez-Martinez, D. & O'Valle, F. (2010b) Optimal microvessel density from composite graft of autogenous maxillary cortical bone and anorganic bovine bone in sinus augmentation: influence of clinical variables. *Clinical Oral Implants Research* **21**: 221–227.
- Ganss, B., Kim, R.H. & Sodek, J. (1999) Bone sialoprotein. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine* **10**: 79–98.
- Haas, R., Donath, K., Fodinger, M. & Watzek, G. (1998) Bovine hydroxyapatite for maxillary sinus grafting: comparative histomorphometric findings in sheep. *Clinical Oral Implants Research* **9**: 107–116.
- Hallman, M., Hedlin, M., Sennerby, L. & Lundgren, S. (2002a) A prospective 1-year clinical and radiographic study of implants placed after maxillary sinus floor augmentation with bovine hydroxyapatite and autogenous bone. *The International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* **60**: 277–284.
- Hallman, M., Sennerby, L. & Lundgren, S. (2002b) A clinical and histologic evaluation of implant integration in the posterior maxilla after sinus floor augmentation with autogenous bone, bovine hydroxyapatite, or a 20:80 mixture. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* **17**: 635–643.
- Katayama, Y., House, C.M., Udagawa, N., Kazama, J.J., McFarland, R.J., Martin, T.J. & Findlay, D.M. (1998) Casein kinase 2 phosphorylation of recombinant rat osteopontin enhances adhesion of osteoclasts but not osteoblasts. *Journal of Cellular Physiology* **176**: 179–187.
- Levin, L., Herzberg, R., Dolev, E. & Schwartz-Arad, D. (2004) Smoking and complications of onlay bone grafts and sinus lift operations. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* **19**: 369–373.
- Lundgren, S., Andersson, S., Gualini, F. & Sennerby, L. (2004) Bone reformation with sinus membrane elevation: a new surgical technique for maxillary sinus floor augmentation. *Clinical Implant Dentistry & Related Research* **6**: 165–173.
- Martos Diaz, P., Naval Gias, L., Sastre Perez, J., Gonzalez Garcia, R., Bances del Castillo, F., Mancha de la Plata, M., Galindo Moreno, P. & Munoz Guerra, M. (2007) Sinus elevation by in situ utilization of bone scrapers: technique and results. *Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal* **12**: E537–E541.
- Matusan-Ilijas, K., Behrem, S., Jonjic, N., Zarkovic, K. & Lucin, K. (2008) Osteopontin expression correlates with angiogenesis and survival in malignant astrocytoma. *Pathology Oncology Research* **14**: 293–298.
- Mayfield, L.J., Skoglund, A., Hising, P., Lang, N.P. & Attstrom, R. (2001) Evaluation following functional loading of titanium fixtures placed in ridges augmented by deproteinized bone mineral. A human case study. *Clinical Oral Implants Research* **12**: 508–514.
- McKee, M.D. & Nanci, A. (1995) Osteopontin and the bone remodeling sequence. Colloidal-gold immunocytochemistry of an interfacial extracellular matrix protein. *Annals of the New York Academy of Sciences* **760**: 177–189.
- Milam, S.B., Haskin, C., Zardeneta, G., Chen, D., Magnuson, V.L., Klebe, R.J. & Steffenson, B. (1991) Cell adhesion proteins in oral biology. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine* **2**: 451–491.
- Mordenfeld, A., Hallman, M., Johansson, C.B. & Albrektsson, T. (2010) Histological and histomorphometrical analyses of biopsies harvested 11 years after maxillary sinus floor augmentation with deproteinized bovine and autogenous bone. *Clinical Oral Implants Research* **21**: 961–970.
- Nkenke, E. & Stelzle, F. (2009) Clinical outcomes of sinus floor augmentation for implant placement using autogenous bone or bone substitutes: a systematic review. *Clinical Oral Implants Research* **20** (Suppl. 4): 124–133.
- Noda, M., Rittling, S.R., Muguruma, Y., Asou, Y., Yoshitake, H. & Tsuji, K. (1998) Osteopontin-deficient mice (OD^{-/-}) cells exhibit enhanced actin fiber formation and spreading while OD^{-/-} osteoclasts are less efficient in removing hydroxyapatite coated on glass and in recruitment to ectopically implanted bone matrix (abstract). *Journal of Biomedical Materials Research* **23**: S220.
- O'Leary, T.J., Drake, R.B. & Naylor, J.E. (1972) The plaque control record. *Journal of Periodontology* **43**: 38.
- Peleg, M., Garg, A.K., Misch, C.M. & Mazor, Z. (2004) Maxillary sinus and ridge augmentations using a surface-derived autogenous bone graft. *The International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* **62**: 1535–1544.
- Perrotti, V., Nicholls, B.M., Horton, M.A. & Piattelli, A. (2009) Human osteoclast formation and activity on a xenogenous bone mineral. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A* **90**: 238–246.
- Razzouk, S., Brunn, J.C., Qin, C., Tye, C.E., Goldberg, H.A. & Butler, W.T. (2002) Osteopontin posttranslational modifications, possibly phosphorylation, are required for in vitro bone resorption but not osteoclast adhesion. *Bone* **30**: 40–47.
- Rios, H.F., Avila, G., Galindo, P., Bratu, E. & Wang, H.L. (2009) The influence of remaining alveolar bone upon lateral window sinus augmentation implant survival. *Implant Dentistry* **18**: 402–412.
- Rosenlicht, J.L. & Tamow, D.P. (1999) Human histologic evidence of integration of functionally loaded hydroxyapatite-coated implants placed simultaneously with sinus augmentation: a case report 2/2 years postplacement. *The Journal of Oral Implantology* **25**: 7–10.
- Sartori, S., Silvestri, M., Forni, F., Cornaglia, A.I., Tesei, P. & Cattaneo, V. (2003) Ten-year follow-up in a maxillary sinus augmentation using anorganic bovine bone (Bio-Oss). A case report with histomorphometric evaluation. *Clinical Oral Implants Research* **14**: 369–372.
- Schlegel, K.A., Fichtner, G., Schultze-Mosgau, S. & Wiltfang, J. (2003) Histologic findings in sinus augmentation with autogenous bone chips versus a bovine bone substitute. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* **18**: 53–58.
- Schuklenk, U. & Ashcroft, R. (2000) International research ethics. *Bioethics* **14**: 158–172.
- Smiler, D.G., Johnson, P.W., Lozada, J.L., Misch, C., Rosenlicht, J.L., Tatum, O.H. Jr & Wagner, J.R. (1992) Sinus lift grafts and endosseous implants. Treatment of the atrophic posterior maxilla. *Dental Clinics of North America* **36**: 151–186; discussion 187–158.
- Sodek, J., Chen, J., Nagata, T., Kasugai, S., Todescan, R. Jr, Li, I.W. & Kim, R.H. (1995) Regulation of osteopontin expression in osteoblasts. *Annals of the New York Academy of Sciences* **760**: 223–241.
- Sodek, J., Ganss, B. & McKee, M.D. (2000) Osteopontin. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine* **11**: 279–303.
- Soltan, M. & Smiler, D.G. (2005) Antral membrane balloon elevation. *The Journal of Oral Implantology* **31**: 85–90.
- Tadjoedin, E.S., de Lange, G.L., Bronckers, A.L., Lyaruu, D.M. & Burger, E.H. (2003) Deproteinized cancellous bovine bone (Bio-Oss) as bone substitute for sinus floor elevation. A retrospective, histomorphometrical study of five cases. *Journal of Clinical Periodontology* **30**: 261–270.
- Thorwarth, M., Schlegel, K.A., Wehrhan, F., Srour, S. & Schultze-Mosgau, S. (2006) Acceleration of de novo bone formation following application of autogenous bone to particulated anorganic bovine material in vivo. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics* **101**: 309–316.
- Traini, T., Valentini, P., Iezzi, G. & Piattelli, A. (2007) A histologic and histomorphometric evaluation of anorganic bovine bone retrieved 9 years after a sinus augmentation procedure. *Journal of Periodontology* **78**: 955–961.
- Valentini, P., Abensur, D., Densari, D., Graziani, J.N. & Hammerle, C. (1998) Histological evaluation of Bio-Oss in a 2-stage sinus floor elevation and implantation procedure. A human case report. *Clinical Oral Implants Research* **9**: 59–64.
- Vercellotti, T., De Paoli, S. & Nevins, M. (2001) The piezoelectric bony window osteotomy and sinus membrane elevation: introduction of a new technique for simplification of the sinus augmentation procedure. *The International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry* **21**: 561–567.
- Wallace, S.S. & Froum, S.J. (2003) Effect of maxillary sinus augmentation on the survival of endosseous dental implants. A systematic review. *Annals of Periodontology* **8**: 328–343.
- Wallace, S.S., Froum, S.J., Cho, S.C., Elian, N., Monteiro, D., Kim, B.S. & Tamow, D.P. (2005) Sinus augmentation utilizing anorganic bovine bone (Bio-Oss) with absorbable and nonabsorbable membranes placed over the lateral window: histomorphometric and clinical analyses. *The International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry* **25**: 551–559.

- Wallace, S.S., Froum, S.J. & Tarnow, D.P. (1996) Histologic evaluation of a sinus elevation procedure: a clinical report. *The International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry* **16**: 46–51.
- Wang, H.L. & Katranji, A. (2008) ABC sinus augmentation classification. *The International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry* **28**: 383–389.
- Watzek, G., Fürst, G. & Gruber, R. (2006) Biologic basis of sinus grafting. In: Jensen, O.T., ed. *The Sinus Bone Graft*. 1st edition, 13–26. Hanover Park, IL: Quintessence Books.
- Wheeler, S.L. (1997) Sinus augmentation for dental implants: the use of alloplastic materials. *The International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* **55**: 1287–1293.
- Yamate, T., Mocharla, H., Taguchi, Y., Igietseme, J.U., Manolagas, S.C. & Abe, E. (1997) Osteopontin expression by osteoclast and osteoblast progenitors in the murine bone marrow: demonstration of its requirement for osteoclastogenesis and its increase after ovariectomy. *Endocrinology* **138**: 3047–3055.
- Yildirim, M., Spiekermann, H., Handt, S. & Edelhoff, D. (2001) Maxillary sinus augmentation with the xenograft Bio-Oss and autogenous intraoral bone for qualitative improvement of the implant site: a histologic and histomorphometric clinical study in humans. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* **16**: 23–33.
- Zohar, R., Lee, W., Arora, P., Cheifetz, S., McCulloch, C. & Sodek, J. (1997) Single cell analysis of intracellular osteopontin in osteogenic cultures of fetal rat calvarial cells. *Journal of Cellular Physiology* **170**: 88–100.



Predictive Factors for Maxillary Sinus Augmentation Outcomes: A Case Series Analysis

Pablo Galindo-Moreno, DDS, PhD,* Idefonso Moreno-Riestra, DDS,† Gustavo Ávila-Ortiz, DDS, MS, PhD,‡ Miguel Padial-Molina, DDS, PhD,§ Mercedes Gallas-Torreira, DDS, PhD,|| Elena Sánchez-Fernández, DMD, PhD,* Francisco Mesa, DMD,¶ Hom-Lay Wang, DDS, MSD, PhD,# and Francisco O'Valle, MD, PhD**

Tooth loss is generally followed by alveolar bone resorption, primarily due to interrupted functional stimulation via the periodontal ligament, which derives into atrophy.¹ Alveolar bone resorption in the posterior maxilla is accompanied by pneumatization of the maxillary sinus, which usually leads to limited alveolar bone height.^{2,3} When implant-supported restorations are considered, sinus augmentation has been regarded as a valid approach to create enough support for proper implant placement and offset heavy occlusal loads.^{4,5} Maturation, consolidation, and stability of a bone graft rely on the proper formation of a physiologically functional “graft-vital bone complex.”⁶ During

Aim: To determine the influence of different local and systemic factors on histologic, histomorphometric, and radiographic outcomes after maxillary sinus augmentation.

Materials and Methods: Fifty-two sinus augmentation procedures were performed. Grafting material consisted of a mixture of anorganic bovine bone (ABB) and autogenous bone. After 6 months, bone core biopsies were harvested from implant sites for histologic and histomorphometric analyses. Data regarding age, gender, type of edentulism, alcohol consumption, smoking habits, and history of periodontal disease were recorded and statistically analyzed.

Results: Histomorphometric analyses revealed the presence of 35.75% ± 16.42% of vital bone, 40.56% ± 16.23% of nonmineralized tissue, and 23.69% ± 18.23% of

residual ABB particles. Radiographic vertical bone resorption inversely correlated with residual ABB. A significant difference in bone resorption patterns was observed for completely edentulous patients and for those with a history of periodontitis. Tobacco and alcohol negatively influenced vital bone formation after sinus augmentation. Implant and prostheses survival after 2 years of functional loading was not directly affected by patient's individual habits.

Conclusion: Certain patient-related variables such as history of periodontitis, type of edentulism, or smoking/drinking habits play an important role in bone graft maturation after maxillary sinus floor elevation. (*Implant Dent* 2012;21:433–440)

Key Words: Sinus augmentation, dental implants, bone grafting, osteogenesis

*Associate Professor, Department of Oral Surgery and Implant Dentistry, School of Dentistry, University of Granada, Granada, Spain; Visiting Associate Professor, Department of Periodontics and Oral Medicine, School of Dentistry, University of Michigan, Ann Arbor, MI.

†Postdoctoral Student, Department of Periodontics and Oral Medicine, School of Dentistry, University of Michigan, Ann Arbor, MI.

‡Assistant Professor, Department of Periodontics, University of Iowa College of Dentistry, Iowa City, IA.

§Research Fellow, Department of Periodontics and Oral Medicine, School of Dentistry, University of Michigan, Ann Arbor, MI.

||Associate Professor, Department of Comprehensive Adult Dental Care, School of Dentistry, Faculty of Medicine and Odontology, University of Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, Spain.

¶Associate Professor, Department of Periodontology, School of Dentistry, University of Granada, Spain.

#Professor and Director of Graduate Periodontics, Department of Periodontics and Oral Medicine, School of Dentistry, University of Michigan, Ann Arbor, MI.

**Associate Professor, Department of Pathology, School of Medicine, University of Granada, Granada, Spain.

Reprint requests and correspondence to: Pablo Galindo-Moreno, DDS, PhD, C/ Recogidas, 39 5° Izq, 18005 Granada, Spain, Phone: +34-95-852-0658, Fax: +34-95-852-0658, E-mail: pgalindo@ugr.es

ISSN 1056-6163/12/02105-433
Implant Dentistry
Volume 21 • Number 5
Copyright © 2012 by Lippincott Williams & Wilkins
DOI: 10.1097/ID.0b013e3182691959

the healing and consolidation process, a variety of patient-related factors (eg, maxillary sinus anatomy) can influence the outcomes of bone grafting.⁷ Although factors such as smoking, alcohol consumption, and history of periodontitis have been associated with lower implant survival rates,^{8–10} there is limited information available to discern whether these, and other patient-related

factors, may negatively affect the consolidation of a grafting material after sinus augmentation procedures, which may ultimately impact implant survival. Hence, the aim of the present study was to assess the influence of a set of patient-dependent variables on histologic, histomorphometric, and radiographic outcomes after sinus augmentation.

MATERIAL AND METHODS

Subject Recruitment

Patients in the need of sinus augmentation were recruited for this prospective case series study, conducted at the University of Granada (Spain). The study was conducted according to the Declaration of Helsinki¹¹ and was approved by the Ethical Committee of the University of Granada for studies involving human subjects. All patients recruited met the following inclusion criteria: Patients had to be between 18 and 85 years of age, present a physical status according to the American Society of Anesthesiologists I or II, absence of systemic diseases or conditions known to alter bone metabolism, and exhibit adequate oral hygiene, demonstrate by plaque score $\leq 15\%$.¹² Patients were selected on the basis of a current sinus augmentation classification,¹³ in which delayed implant placement is recommended in clinical scenarios where the remaining alveolar bone height (RBH) is ≤ 5 mm. Bone height was radiographically measured using computer software (Dent-A-View v1.0, DigiDent; DIT, Neshar, Israel). Patients were excluded if they were regularly taking medications known to modify bone metabolism (ie, bisphosphonates) or had taken antibiotics for more than 2 weeks in the past 3 months. Patients who were pregnant or attempting to get pregnant were excluded, as well. Likewise, patients presenting acute or chronic sinus pathology (ie, sarcoidosis, osteomas, carcinomas, etc), active sepsis, mucocutaneous diseases, history of cancer or radiation to the head and neck in the past 18 months, chemotherapy in the past 12 months, or had postoperative complications related to these conditions were not included in the study. Patients who met the inclusion/exclusion criteria and wished to participate in the study were asked to read, understand, and sign an informed consent.

Surgical and Restorative Procedures

All patients were asked to take amoxicillin/clavulanic acid every 8 hours (875/125 mg tablets) because none of them reported allergy to this specific antibiotic, starting within 8

hours from the time scheduled for surgery. Sinus augmentation procedures were performed under local anesthesia (Ultracain; Aventis, Inc, Frankfurt, Germany) following the protocol described elsewhere.¹⁴ Briefly, all sinus cavities were grafted using autogenous cortical bone in combination with anorganic bovine bone (ABB) particles ranging from 250 to 1000 μm (Geistlich Bio-Oss; Geistlich Pharma AG, Wolhusen, Switzerland) in a 1:1 ratio. A variable amount of bone graft, ranging from 3 to 5 cm^3 , was used per sinus. After bone graft placement, an absorbable collagen membrane (Geistlich Bio-Gide; Geistlich Pharma AG) was used to cover the lateral aspect of the bony window. Primary wound closure was achieved in all cases. Patients were asked to continue the antibiotic therapy for 7 days after surgery. Patients were also provided for anti-inflammatory medication (ibuprofen 600 mg tablets as needed, to a maximum of 3600 mg per day). Sutures were removed at 2 weeks after sinus augmentation. Patients were followed up for 6 months, in 6 to 8 weeks intervals. After 6 months of healing, implant placement surgery was performed. Two different implant systems were employed (Microdent; Microdent Implant System, Barcelona, Spain; Osseospeed; Astra Tech, Mölndal, Sweden). A full-thickness flap was elevated, and a 3-mm internal and 4-mm external diameter trephine was used to harvest bone core biopsies from the ideal implant position, according to the prosthetic treatment plan. Transepithelial abutments were placed in a second surgical procedure after a 4-month healing period. Implant-supported prostheses were delivered 4 weeks later. All permanent restorations were screw-retained fixed partial dentures. Occlusal adjustment was performed at the time of delivery. After functional loading, all patients were included in a maintenance program.

Data Recorded

Age, gender, number of implants per patient, type of edentulism, current smoking habits, alcohol consumption, and history of periodontal disease were recorded for each patient. Edentulism

was subdivided into 2 categories: partial and complete edentulism. Patients who presented at least 1 missing maxillary posterior tooth, excluding third molars, were considered partially edentulous. Patients who had no remaining teeth in the upper arch were considered completely edentulous. Alcohol consumption was assessed according to the method described by Galindo-Moreno et al in 2005.¹⁵ Smoking habits were recorded using the following criteria: non-smoker, 0 cigarettes/day; mild smoker, ≤ 10 cigarettes/day; heavy smoker, >10 cigarettes/day.¹⁶ Periodontal disease history was determined by the assessment of clinical attachment loss (CAL) using a Michigan-O probe (Hu-Friedy, Chicago, IL). Partially edentulous patients who presented at least 3 sites in nonadjacent teeth exhibiting CAL ≥ 3 mm (excluding third molars) were classified as part of the periodontitis group.¹⁷ All these data were collected in a standardized form by the surgeon, during the screening appointment.

Radiographic Evaluation

Standardized digital panoramic radiographs (Kodak ACR-2000; Eastman Kodak Company, Rochester, NY) were obtained per patient at baseline, 6 months after sinus augmentation, at the time of final restoration delivery, and after 24 months of functional loading. Specialized software (Dent-A-View v1.0, DigiDent; DIT) was used to make linear measurements. Two different examiners, previously calibrated to increase the reliability of the values obtained, conducted the radiographic evaluation. RBH, at the most mesial and distal points of the sinus area to be grafted, was measured on the baseline panoramic radiograph. Similarly, the distance from the apical end of the grafted area to the alveolar crest was measured at the most mesial and distal points in the rest of panoramic radiographs.

Histologic Analysis

Harvested biopsies were immediately fixed in 10% buffered formalin for 24 hours and then decalcified in a solution containing formaldehyde (10% wt/vol), formic acid (8% wt/vol),

and methanol (1% wt/vol) during at least 20 days (Decalcifier I; Surgipath Europe, Ltd, Peterborough, United Kingdom). Samples were subsequently embedded in paraffin, and 4- μ m sections were cut along the central axis of the biopsies. Samples were dewaxed, hydrated, and sections were processed for hematoxylin-eosin, periodic acid-Schiff, Masson trichrome, and Goldner trichrome staining. A millimeter scale in the eyepiece of a BH2 microscope using a $\times 40$ magnification (Olympus Optical Company, Ltd., Tokyo, Japan) was used to count the osteoblasts, osteoclasts, and osteocytes cells per square millimeter. Results were expressed as number of positive cells per square millimeter. Bone histomorphometric analysis was semiautomatically performed by a masked calibrated examiner (F.O.) on Masson trichrome-stained longitudinal sections, by assessing 10 random digital images per sample obtained using a microscope ($\times 10$ magnification) equipped with a digital camera (DP70; Olympus Optical Company, Ltd). Images were transferred to a computer and analyzed using specialized software (Image J; NIH, Bethesda, MD; <http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Vital bone, remaining ABB particles, and nonmineralized tissue percentages were quantified separately. Results were expressed as a percentage. Bone formation was estimated by recording the number of osteoid lines in the total core length.

Statistical Analysis

The influence of age, gender, type of edentulism, number of implants per patient, alcohol consumption, smoking habits at the time of surgery, and history of periodontal disease on histomorphometric and radiographic parameters was statistically analyzed. The Shapiro-Wilk test was used to assess the normality of the variables. After descriptive analysis, Student's *t* test or Welch test for different variances were performed to determine statistical significances. In addition, forward stepwise multiple regression analyses (*P*-to-enter = 0.05) were performed for all the variables. Two different analyses were conducted to evaluate our data. First, to analyze the radiographic

findings regarding the other variables, percentage of remnant ABB particles was the dependent variable, whereas age, gender, type of edentulism, number of implants per patient, alcohol consumption, smoking status, history of periodontal disease, percentage of non-mineralized tissue, and osteoid lines were the predictors. A second analysis was conducted to evaluate the histomorphometric and histologic findings in relation with the other variables, so again the remnant ABB particles was the dependent variable and age, gender, type of edentulism, number of implants per patient, alcohol consumption, smoking status, history of periodontitis, osteoid lines, and percentage of connective tissue were used as predictors. The statistical analysis was performed using the SPSS-Windows 16.0 software (SPSS, Inc, Chicago, IL). A *P* value of <0.05 was considered statistically significant.

RESULTS

Study Population

Fifty-two patients (34 men and 18 women) with a mean age of 49.1 years (ranging from 35 to 72 years) were recruited. In this sample, 27 patients (51.9%) had periodontitis, 13 patients (25%) were fully edentulous (all with a history of periodontal disease), 38 (73.07%) were smokers, and 8 (15.38%) were alcohol consumers. A

total of 52 implants (39 Microdent; Microdent Implant System; and 13 Osseospeed; Astra Tech) were placed. No implant failure was recorded during the study.

Radiographic-Related Analysis

Statistical comparisons for patient-related factors on radiographic bone resorption demonstrated significant differences in terms of bone resorption in patients with a history of periodontitis as compared to those who did not have this condition (0.33 ± 0.12 mm vs 0.21 ± 0.08 mm; *P* = 0.018, Student's *t* test). The same was found for fully edentulous patients when compared to partially edentulous patients (0.34 ± 0.15 mm vs 0.25 ± 0.09 mm; *P* = 0.019, Student's *t* test). However, differences were not significant for non-smokers as compared to both smoking categories or between alcohol consumers and those who were not. With regards to gender, women had a slightly higher, but not statistically significant, mean bone graft resorption than men. Nonetheless, women presented a higher RBH than men at baseline (mesial, 4.62 ± 1.40 mm vs 2.73 ± 2.14 mm, *P* = 0.036; distal, 3.18 ± 1.77 mm vs 2.20 ± 1.23 mm; *P* = 0.13, Student's *t* test). Stepwise multiple regression analysis (*P*-to-enter = 0.05) showed statistical significance only for the percentage of residual ABB particles related to the vertical graft resorption ($R^2 = 0.451$, corrected $R^2 = 0.382$).

Table 1. Morphometric Comparison in Patients With and Without Posterior Edentulous Maxilla in Grafting Sinus

Variables	Partially Edentulous (n = 39)*	Completely Edentulous (n = 13)*	<i>P</i> (Student's <i>t</i> test)
Osteoblasts (number/mm ²)	180.45 \pm 258.60	262.09 \pm 250.69	0.52
Osteoclasts (number/mm ²)	160.05 \pm 208.48	92.74 \pm 162.55	0.45
Osteocytes (number/mm ²)	669.97 \pm 603.91	948.65 \pm 914.27	0.43
Osteoid lines (number)	15.90 \pm 10.51	17.00 \pm 10.73	0.86
Vital bone (%)	39.37 \pm 16.09	50.92 \pm 17.84	0.25
Remaining ABB (%)	56.62 \pm 24.18	17.42 \pm 10.18	0.002
Nonmineralized tissue (%)	35.23 \pm 19.38	48.19 \pm 5.97	0.11

Fully edentulous patients showed an increased resorption of anorganic bovine bone particles compared to partially edentulous patients. *Values are expressed as mean \pm standard deviation.

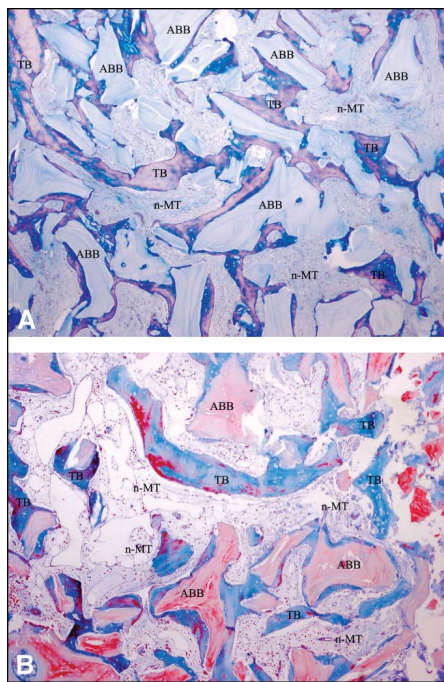


Fig. 1. Comparative images of trephine maxillary sinus augmentation biopsies using a composite graft. **A**, Sample from a partially edentulous patient. **B**, Sample from a patient with complete edentulism. TB, trabecular bone; n-MT, nonmineralized tissue (Masson trichrome stain $\times 4$ magnification).

Histologic and Histomorphometric Analyses

Histomorphometric analysis of 6-month bone core biopsy samples showed a mean of $35.75 \pm 16.42\%$ of vital bone, $40.56\% \pm 16.23\%$ of nonmineralized tissue, and $23.69\% \pm 18.23\%$ of remaining ABB particles. The mean number of osteoblasts and osteoclasts found per square millimeter was 134.65 ± 190.54 and 93.21 ± 153.38 , respectively, whereas the mean number of osteocytes was 508.02 ± 543.7 .

No statistically significant relationship was observed for vital bone with any clinical variable. When examining the effect of age and gender upon graft remodeling, only age correlated negatively with the number of osteoblasts per square millimeter ($r = -0.473$; $P < 0.001$, Pearson test). Completely edentulous patients showed a higher percentage of vital bone, higher proportion of nonmineralized tissues, and less remaining ABB particles (Table 1). However, differences between total and partial edentulous patients were significant only for the percentage of remaining ABB particles (Table 1; Fig. 1).

Patients with a history of periodontitis presented a statistically significantly higher number of osteoblasts per square millimeter, higher quantity of nonmineralized tissue, a lower percentage of remaining ABB particles, and less osteoid lines when compared to nonperiodontal patients (Table 2; Fig. 2). Stepwise multiple regression analysis (P -to-enter = 0.05) using ABB particles as the dependent variable and age, gender, type of edentulism, number of implants per patient, alcohol consumption, smoking status, history of periodontitis, osteoid lines, and percentage of connective tissue as predictors revealed that only history of periodontitis make a significant contribution ($R^2 = 0.568$, corrected $R^2 = 0.514$).

There were no statistical differences between smoking graduation within groups, so to improve the understanding of these results, we harmonized them, and the influence of smoking and alcohol on healing after sinus augmentation at the morphologic and histomorphometric

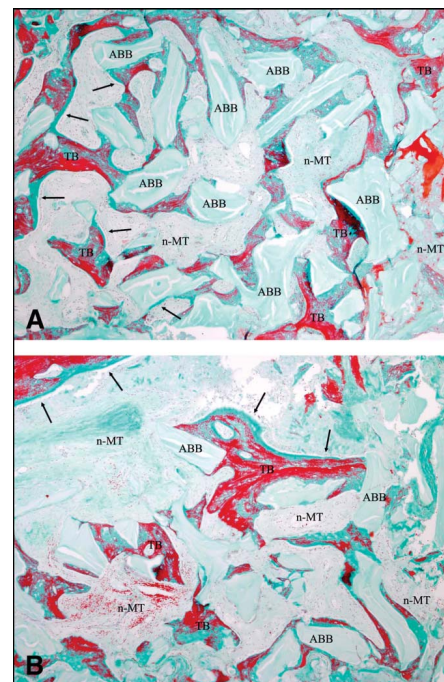


Fig. 2. Comparative images of trephine biopsies of patients undergoing maxillary sinus augmentation with composite graft. Note the different number of osteoid lines (arrows). **A**, Sample representative of a non-periodontitis patient. **B**, Sample from a periodontitis patient. TB, trabecular bone; n-MT, nonmineralized tissue (Masson trichrome stain $\times 4$ magnification).

levels is displayed in Table 3. A low number of osteoid lines were found in these individuals. Tobacco consumption correlated directly with the history of periodontitis ($\rho = 0.521$; $P = 0.004$), number of osteoblasts per square millimeter ($\rho = 0.544$; $P = 0.044$), and percentage of nonmineralized tissue ($\rho = 0.521$; $P = 0.046$).

DISCUSSION

Limited information is currently available regarding the influence that age, gender, alcohol consumption, smoking status, and periodontal disease history may have on sinus augmentation outcomes. Our aim was to analyze how these variables could influence bone graft consolidation in the maxillary sinus augmentation model in human subjects. Our group has previously studied bone healing response after sinus augmentation using different biomaterials,^{18,19} particularly focused in the combination of ABB and autogenous bone,^{14,20,21} which was the

Table 2. Histomorphometric Data for Patients With and Without History of Periodontitis			
Variables	Nonperiodontitis (n = 25)*	Periodontitis (n = 27)*	P (Welch test)
Osteoblasts (No./mm ²)	91.39 \pm 56.45	309.58 \pm 315.02	0.05
Osteoclasts (No./mm ²)	164.87 \pm 115.32	115.32 \pm 204.02	0.59
Osteocytes (No./mm ²)	537.63 \pm 380.23	956.24 \pm 874.83	0.19
Osteoid lines (No.)	23.23 \pm 6.57	14.25 \pm 11.38	0.014
Vital bone (%)	41.60 \pm 18.88	45.20 \pm 17.03	0.73
Remaining ABB (%)	68.60 \pm 12.25	24.63 \pm 19.60	0.0001
Nonmineralized tissue (%)	23.51 \pm 11.64	50.65 \pm 8.30	0.003

A greater number of osteoblasts per square millimeter and percentage of nonmineralized tissue together with lower remodeling activity were reflected by significantly less osteoid lines and less ABB particles in those patients with a history of periodontal disease. *Values are expressed as mean \pm standard deviation.

Table 3. Effect of Smoking and Alcohol in Morphologic and Histomorphometric Data of Maxillary Grafting

Variables	Alcohol Consumer*		P	Smoker*		P
	No (n = 44)	Yes (n = 8)		No (n = 14)	Yes (n = 38)	
Osteoblasts (number/mm ²)	305.2 ± 93.2	181.1 ± 162.5	0.0001	56.4 ± 38.9	337.3 ± 276.7	0.024
Osteoclasts (number/mm ²)	171.5 ± 196.7	0.0 ± 0.0	0.0001	177.4 ± 141.2	115.9 ± 196.4	0.64
Osteocytes (number/mm ²)	1130.9 ± 741.7	841.6 ± 756.4	0.28	758.1 ± 349.4	1146.6 ± 809.8	0.16
Osteoid lines (No.)	19.9 ± 10.7	10.0 ± 0.1	0.0001	25.4 ± 5.9	15.6 ± 10.6	0.27
Vital bone (%)	50.2 ± 15.8	39.0 ± 9.1	0.007	50.0 ± 16.8	46.7 ± 14.8	0.68
Remaining ABB (%)	36.5 ± 26.9	25.3 ± 4.2	0.02	65.0 ± 13.8	24.8 ± 7.9	0.038
Nonmineralized tissue (%)	42.1 ± 18.3	42.8 ± 0.6	0.15	26.8 ± 9.0	46.7 ± 14.6	0.05

Lower cellularity, less number of osteoid lines, less vital bone, and more bone resorption was observed in patients with increased level of alcohol consumption. Similar histological effects were noted in patients with higher tobacco consumption.

*Values are expressed as mean ± typical deviation (Welch test).

grafting material used in this particular study. Differences in the healing response after sinus grafting may be attributable to variations in some of the aforesaid patient-related factors.

Regarding the age and gender of the patients, we observed a reduced number of osteoblasts per square millimeter with increasing age. This is in agreement with Zhang et al.²² They showed that women between 45 and 65 years of age had a reduced osteoblast function. Interestingly, osteoblast function in

male donors (range, 45–65 years) was similar to younger male and female patients (young was defined as younger than 30 years of age). This result suggests that age does not play a significant role in osteoblast function in men. However, this seems to be different for women. Conversely, a recent study found no differences between biopsies obtained from male and female patients aged from 45 to 65 years.²³ Along these lines, in a previous study, we did not find differences in vessel density in biopsies obtained from a similar population to this study in terms of gender distribution.²⁴ Analysis of the relationship between age and radiographic outcomes revealed that reduced RBH correlated with increasing age. In the present study, histologic analysis also revealed that women had less osteoid lines than men, suggesting lower cell activity and tissue response in the grafted area. Our results support previous reports, indicating that women had less maxillary bone density when compared to men.^{25,26}

Taking in consideration the tobacco, histomorphometric results showed that samples obtained from smokers presented a significantly higher number of osteoblasts than those obtained from nonsmokers. Smoking negatively affects the expression of certain hormones (parathyroid hormone) and enzymes involved in the regulation of bone homeostasis.²⁷ In addition, it has been observed that alkaline phosphatase activity is significantly lower in cells cultured with nicotine than in controls.^{28,29} These *in vitro* effects of nicotine on bone cells could

be attributed to different conditions of culturing, or origin of osteoblasts, among other factors. In our study, increased resorption was found in the biopsies from smokers. This finding was associated with a low percentage of remaining ABB particles (Fig. 3). Among elderly people, aged 67 to 77 years, heavy smokers have an increased bone remodeling capacity compared to nonsmokers.³⁰

Some investigators have highlighted more implant marginal bone loss in smokers^{31–33} and higher early implant failure.^{34,35} Low percentage of vital bone and bone density, together with higher resorption in smokers, has been shown in different meta-analyses. This finding is also compatible with the hypothesis of an inverse relation between smoking and total bone mass. The relationship seems to be dose and age dependent, so the heavier the habit is and the older the patient is, the less amount of bone mass.^{27,36} In addition, it has been reported that the detrimental effects derived from smoking were more pronounced in the maxilla than in the mandible. Conceptually, maxillary bone could be more susceptible to the adverse effect of smoking because it has a lower density naturally.³⁷ Retrospective studies and systematic reviews have also found a strong association between smoking and higher implant failure rate in the maxilla.^{38,39}

Alcohol intake resulted an influent factor too. In our sample, all subjects consuming >10 g of alcohol/day were also heavy smokers, although the opposite was not observed. Alcohol consumption has been positively associated with different smoking levels

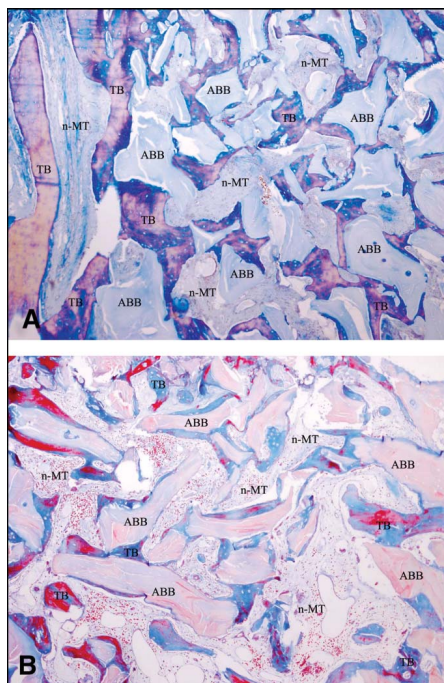


Fig. 3. Comparative images of trephine biopsies of patients undergoing maxillary sinus augmentation with composite graft. **A**, Nonsmoker sample. **B**, Smoker sample. TB, trabecular bone; n-MT, nonmineralized tissue (Masson trichrome stain ×4 magnification).

within the smoking continuum.⁴⁰ Kitsantas et al⁴¹ have suggested that social and health risks, such as alcohol use, have an impact on adolescents' behavior and beliefs through peer smoking. A synergistic negative effect of both habits could impact on healing, in terms of deficient bone apposition and inadequate vital bone formation. Data from this study showed that patients who reported consuming ≥ 10 g of alcohol per day exhibited lower cellularity, less number of osteoid lines, less vital bone, and more bone resorption than patients below that level of alcohol consumption. This finding is in accordance with the observation by 2 different groups of investigators who reported increased bone resorption in patients who consumed more than 10 g/day alcohol.^{15,42} Although it is not possible to separate the likely action exerted by the smoking in these patients, the differences observed in those who were not alcohol drinkers could be explained by the direct toxic effect of alcohol on periodontal tissues and bone metabolism.^{43,44} Farley et al⁴⁵ also found that bone formation was inhibited and bone resorption increased when tibia of embryonic chicks were acutely exposed to ethanol. Furthermore, histomorphometric studies and scanning electron microscopy of trabecular bone biopsies obtained from the iliac crest have consistently shown signs of reduced bone formation, such as decreased osteoblasts and reduced rate of bone mineralization, among history of long-term alcohol abuse.^{46,47}

Residual ridge resorption and anatomical features of the posterior maxillary bone play a capital role in the graft maturation. In this study, ABB particles resorption was increased in fully edentulous patients compared to partially edentulous patients. Our group has demonstrated previously that longer distances between the bony walls in the sinus cavity imply less final vital bone in the grafted area.⁷ Residual ridge resorption and bone remodeling are usually more rapid in the premolar and molar region than in the anterior area of the maxilla.⁴⁸ This difference can be explained by different reasons. First, lower biomechanical function in edentulous areas promotes resorption. Bassi

et al²⁵ reported that the presence of teeth affects the density of the trabecular bone because the bone in the incisal and canine area differ from that of the molar area. Second, patients wearing removable dentures develop increased alveolar bone resorption, given the superficial pressure on the supporting tissues. Third, recent findings have demonstrated the presence of periodontopathogenic bacteria in edentulous patients with a history of periodontitis, even after all the teeth had been removed.⁴⁹ In our samples, an intense relationship between edentulism and periodontitis was detected, which could factor in the increased graft resorption found in these patients, given the presence of pathogens in the graft.⁵⁰ On the other hand, some authors, such as Davies,⁵¹ advocate that the posterior maxilla is an exceptional recipient site for implant placement because of its biologic properties, rather than its biomechanical features. Ideally, computer tomographic (CT) scans should be considered the primary diagnostic option to design a treatment plan for maxillary sinus augmentation. Likewise, the cost and the higher radiation dose as compared to other radiographic methods are major disadvantages of CT (860–540 μ Sv vs 5.5–22 μ Sv, CT vs panoramic images, respectively).^{52,53} Angelopoulos et al⁵⁴ argued that CT images should not necessarily replace digital panoramic images. Guidelines of European Association for Osseointegration also focus on cross-sectional imaging but leave to the discretion of the clinician on the use of 2-dimensional imaging in minor and established low-risk surgery.⁵⁵

Considering the periodontal status, we observed a greater number of osteoblasts per square millimeter and percentage of nonmineralized tissue together with lower remodeling activity, reflected by significantly less osteoid lines and less ABB particles, in patients with a history of periodontal disease. ABB has been used widely for periodontal regeneration,^{56,57} and more recently for periimplantitis defects treatment^{58,59} with positive clinical and radiographic outcomes. Nonetheless, to our knowledge, few previous histologic analyses of the behavior of this biomaterial in periodontal patients

have been reported in humans.⁶⁰ In many cases, patient with periodontitis have a genetic predisposition that predisposes them to respond with an exacerbated inflammatory reaction after tissue injury.⁶¹ Also, osteoclast activity mediated by hormones, cytokines (such as IL-1 and IL-6), or certain bacterial components (such as lipopolysaccharides) could promote cytokine-mediated resorption.⁶² Verdugo et al⁵⁰ has confirmed osseous microbial contamination with major periodontopathogens in individuals undergoing maxillary sinus augmentation with a history of periodontitis. This study showed positive association between bone loss in the augmented sinuses and the presence of aggressive periodontopathogens in the harvested bone particles with scraper. It is plausible to speculate that certain bacterial components may show the ability to stimulate cytokine production by target cells other than osteoblasts and therefore induce greater bone loss in regenerative procedures.⁵⁰ The majority of patients who required sinus augmentation in the present study had a history of periodontitis (51.9%). The low amount of remaining ABB associated with a history of periodontitis ($24.63 \pm 19.60\%$, $P = 0.0001$ Welch test) in our study could have an impact in the higher bone graft resorption because structural stability by ABB particles was lost. These particles could have been affected by resorptive phenomena mediated by osteoclast activation induced by proinflammatory cytokines.⁶³ Nonetheless, the clinical success in our series of cases showed no differences between patients with or without a history of periodontal disease. This may be due to the fact that graft resorption was just around 0.1 mm greater after 6 months of sinus graft when implants were placed, both in patients with a history of periodontal disease or full edentulous. Therefore, these variables showed a low clinical impact on sinus augmentation outcomes, despite its statistical significance.

CONCLUSIONS

Although clinical outcomes were not negatively affected, certain clinical factors, namely, age, habits as tobacco use or alcohol intake, residual ridge resorption after extraction, and history of

periodontitis play an important role in the final bone quality resulting after grafting. From the histomorphometric point of view, the final quantity of remaining ABB was influenced by the related patient-dependent variables. Consequently, a negative correlation between the amount of remaining ABB and radiographical vertical graft resorption was also observed.

DISCLOSURE

The authors do not have any financial interests, either directly or indirectly, in the products listed in the study.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was partially supported by Junta de Andalucía (Spain) Funding Program for research groups in Spain (Projects #CTS-138 and #CTS 583). The authors thank María Dolores Rodríguez, Jorge A. Payá, and Mohamed Tassi, Laboratory technicians at the Department of Pathology and IBIMER, and Professor Andrés Catena, from the School of Psychology, University of Granada, for their collaboration in the development of this study.

REFERENCES

- Cardaropoli G, Araujo M, Lindhe J. Dynamics of bone tissue formation in tooth extraction sites. An experimental study in dogs. *J Clin Periodontol*. 2003;30:809–818.
- Del Fabbro M, Rosano G, Taschieri S. Implant survival rates after maxillary sinus augmentation. *Eur J Oral Sci*. 2008;116:497–506.
- Rios HF, Avila G, Galindo P, et al. The influence of remaining alveolar bone upon lateral window sinus augmentation implant survival. *Implant Dent*. 2009;18:402–412.
- Nkenke E, Stelzle F. Clinical outcomes of sinus floor augmentation for implant placement using autogenous bone or bone substitutes: a systematic review. *Clin Oral Implants Res*. 2009;20(suppl 4):124–133.
- Pjetursson BE, Tan WC, Zwahlen M, et al. A systematic review of the success of sinus floor elevation and survival of implants inserted in combination with sinus floor elevation. *J Clin Periodontol*. 2008;35(8 suppl):216–240.
- Busenlechner D, Huber CD, Vasak C, et al. Sinus augmentation analysis revised: the gradient of graft consolidation. *Clin Oral Implants Res*. 2009;20:1078–1083.
- Avila G, Wang HL, Galindo-Moreno P, et al. The influence of the bucco-palatal distance on sinus augmentation outcomes. *J Periodontol*. 2010;81:1041–1050.
- Anner R, Grossmann Y, Anner Y, et al. Smoking, diabetes mellitus, periodontitis, and supportive periodontal treatment as factors associated with dental implant survival: a long-term retrospective evaluation of patients followed for up to 10 years. *Implant Dent*. 2010;19:57–64.
- Kan JY, Rungcharassaeng K, Kim J, et al. Factors affecting the survival of implants placed in grafted maxillary sinuses: a clinical report. *J Prosthet Dent*. 2002;87:485–489.
- Levin L, Schwartz-Arad D. The effect of cigarette smoking on dental implants and related surgery. *Implant Dent*. 2005;14:357–361.
- Schuklenk U, Ashcroft R. International research ethics. *Bioethics*. 2000;14:158–172.
- O'Leary TJ, Drake RB, Naylor JE. The plaque control record. *J Periodontol*. 1972;43:38.
- Wang HL, Katranji A. ABC sinus augmentation classification. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2008;28:383–389.
- Galindo-Moreno P, Avila G, Fernandez-Barbero JE, et al. Evaluation of sinus floor elevation using a composite bone graft mixture. *Clin Oral Implants Res*. 2007;18:376–382.
- Galindo-Moreno P, Fauri M, Avila-Ortiz G, et al. Influence of alcohol and tobacco habits on peri-implant marginal bone loss: a prospective study. *Clin Oral Implants Res*. 2005;16:579–586.
- Wallace RH. The relationship between cigarette smoking and dental implant failure. *Eur J Prosthodont Restor Dent*. 2000;8:103–106.
- Tonetti MS, Claffey N. Advances in the progression of periodontitis and proposal of definitions of a periodontitis case and disease progression for use in risk factor research. Group C consensus report of the 5th European Workshop in Periodontology. *J Clin Periodontol*. 2005;32(suppl 6):210–213.
- Avila G, Neiva R, Misch CE, et al. Clinical and histologic outcomes after the use of a novel allograft for maxillary sinus augmentation: a case series. *Implant Dent*. 2010;19:330–341.
- Galindo-Moreno P, Avila G, Fernandez-Barbero JE, et al. Clinical and histologic comparison of two different composite grafts for sinus augmentation: a pilot clinical trial. *Clin Oral Implants Res*. 2008;19:755–759.
- Galindo-Moreno P, Moreno-Riestra I, Avila G, et al. Histomorphometric comparison of maxillary pristine bone and composite bone graft biopsies obtained after sinus augmentation. *Clin Oral Implants Res*. 2010;21:122–128.
- Galindo-Moreno P, Moreno-Riestra I, Avila G, et al. Effect of anorganic bovine bone to autogenous cortical bone ratio upon bone remodeling patterns following maxillary sinus augmentation. *Clin Oral Implants Res*. 2011;22:857–864.
- Zhang H, Lewis CG, Aronow MS, et al. The effects of patient age on human osteoblasts' response to Ti-6Al-4V implants in vitro. *J Orthop Res*. 2004;22:30–38.
- Knabe C, Koch C, Rack A, et al. Effect of beta-tricalcium phosphate particles with varying porosity on osteogenesis after sinus floor augmentation in humans. *Biomaterials*. 2008;29:2249–2258.
- Galindo-Moreno P, Padial-Molina M, Fernandez-Barbero JE, et al. 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*. 2010;21:221–227.
- Bassi F, Procchio M, Fava C, et al. Bone density in human dentate and edentulous mandibles using computed tomography. *Clin Oral Implants Res*. 1999;10:356–361.
- Solar P, Ulm CW, Thornton B, et al. Sex-related differences in the bone mineral density of atrophic mandibles. *J Prosthet Dent*. 1994;71:345–349.
- Ward KD, Klesges RC. A meta-analysis of the effects of cigarette smoking on bone mineral density. *Calcif Tissue Int*. 2001;68:259–270.
- Katono T, Kawato T, Tanabe N, et al. Effects of nicotine and lipopolysaccharide on the expression of matrix metalloproteinases, plasminogen activators, and their inhibitors in human osteoblasts. *Arch Oral Biol*. 2009;54:146–155.
- Ramp WK, Lenz LG, Galvin RJ. Nicotine inhibits collagen synthesis and alkaline phosphatase activity, but stimulates DNA synthesis in osteoblast-like cells. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1991;197:36–43.
- Elgan C, Samsioe G, Dykes AK. Influence of smoking and oral contraceptives on bone mineral density and bone remodeling in young women: a 2-year study. *Contraception*. 2003;67:439–447.
- DeLuca S, Zarb G. The effect of smoking on osseointegrated dental implants. Part II: peri-implant bone loss. *Int J Prosthodont*. 2006;19:560–566.
- Lindquist LW, Carlsson GE, Jemt T. Association between marginal bone loss

around osseointegrated mandibular implants and smoking habits: a 10-year follow-up study. *J Dent Res.* 1997;76:1667-1674.

33. Penarrocha M, Palomar M, Sanchis JM, et al. Radiologic study of marginal bone loss around 108 dental implants and its relationship to smoking, implant location, and morphology. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2004;19:861-867.

34. Mesa F, Munoz R, Noguerol B, et al. Multivariate study of factors influencing primary dental implant stability. *Clin Oral Implants Res.* 2008;19:196-200.

35. Noguerol B, Munoz R, Mesa F, et al. Early implant failure. Prognostic capacity of periosteal: retrospective study of a large sample. *Clin Oral Implants Res.* 2006;17:459-464.

36. Law MR, Hackshaw AK. A meta-analysis of cigarette smoking, bone mineral density and risk of hip fracture: recognition of a major effect. *BMJ.* 1997;315:841-846.

37. Haas R, Haimbock W, Mailath G, et al. The relationship of smoking on peri-implant tissue: a retrospective study. *J Prosthet Dent.* 1996;76:592-596.

38. De Bruyn H, Collaert B. The effect of smoking on early implant failure. *Clin Oral Implants Res.* 1994;5:260-264.

39. Esposito M, Hirsch JM, Lekholm U, et al. Biological factors contributing to failures of osseointegrated oral implants. (I). Success criteria and epidemiology. *Eur J Oral Sci.* 1998;106:527-551.

40. Flay BR, Hu FB, Richardson J. Psychosocial predictors of different stages of cigarette smoking among high school students. *Prev Med.* 1998;27:A9-A18.

41. Kitsantas P, Moore TW, Sly DF. Using classification trees to profile adolescent smoking behaviors. *Addict Behav.* 2007;32:9-23.

42. Diez A, Serrano S, Cucurull J, et al. Acute effects of ethanol on mineral metabolism and trabecular bone in Sprague-Dawley rats. *Calcif Tissue Int.* 1997;61:168-171.

43. Tezal M, Grossi SG, Ho AW, et al. The effect of alcohol consumption on peri-

odontal disease. *J Periodontol.* 2001;72:183-189.

44. Tezal M, Grossi SG, Ho AW, et al. Alcohol consumption and periodontal disease. The Third National Health and Nutrition Examination Survey. *J Clin Periodontol.* 2004;31:484-488.

45. Farley JR, Fitzsimmons R, Taylor AK, et al. Direct effects of ethanol on bone resorption and formation in vitro. *Arch Biochem Biophys.* 1985;238:305-314.

46. Chappard D, Plantard B, Petitjean M, et al. Alcoholic cirrhosis and osteoporosis in men: a light and scanning electron microscopy study. *J Stud Alcohol.* 1991;52:269-274.

47. Crilly RG, Anderson C, Hogan D, et al. Bone histomorphometry, bone mass, and related parameters in alcoholic males. *Calcif Tissue Int.* 1998;43:269-276.

48. Xie Q, Wolf J, Ainamo A. Quantitative assessment of vertical heights of maxillary and mandibular bones in panoramic radiographs of elderly dentate and edentulous subjects. *Acta Odontol Scand.* 1997;55:155-161.

49. Van Assche N, Van Essche M, Pauwels M, et al. Do periodontopathogens disappear after full-mouth tooth extraction? *J Clin Periodontol.* 2009;36:1043-1047.

50. Verdugo F, Castillo A, Moragues MD, et al. Bone microbial contamination influences autogenous grafting in sinus augmentation. *J Periodontol.* 2009;80:1355-1364.

51. Davies JE. Understanding peri-implant endosseous healing. *J Dent Educ.* 2003;67:932-949.

52. Gijbels F, Jacobs R, Bogaerts R, et al. Dosimetry of digital panoramic imaging. Part I: patient exposure. *Dentomaxillofac Radiol.* 2005;34:145-149.

53. Ludlow JB, Ivanovic M. Comparative dosimetry of dental CBCT devices and 64-slice CT for oral and maxillofacial radiology. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2008;106:106-114.

54. Angelopoulos C, Thomas SL, Hechler S, et al. Comparison between digital panoramic radiography and cone-beam computed tomography for the identification of the mandibular canal as part of presur-

gical dental implant assessment. *J Oral Maxillofac Surg.* 2008;66:2130-2135.

55. Harris D, Buser D, Dula K, et al. E. A.O. guidelines for the use of diagnostic imaging in implant dentistry. A consensus workshop organized by the European Association for Osseointegration in Trinity College Dublin. *Clin Oral Implants Res.* 2002;13:566-570.

56. Camargo PM, Lekovic V, Weinlaender M, et al. Platelet-rich plasma and bovine porous bone mineral combined with guided tissue regeneration in the treatment of intrabony defects in humans. *J Periodontol Res.* 2002;37:300-306.

57. Sculean A, Schwarz F, Chiantella GC, et al. Five-year results of a prospective, randomized, controlled study evaluating treatment of intra-bony defects with a natural bone mineral and GTR. *J Clin Periodontol.* 2007;34:72-77.

58. Esposito M, Grusovin MG, Kakisis I, et al. Interventions for replacing missing teeth: treatment of perimplantitis. *Cochrane Database Syst Rev.* 2008;CD004970.

59. Schou S, Holmstrup P, Jorgensen T, et al. Anorganic porous bovine-derived bone mineral (Bio-Oss) and ePTFE membrane in the treatment of peri-implantitis in cynomolgus monkeys. *Clin Oral Implants Res.* 2003;14:535-547.

60. Sculean A, Stavropoulos A, Windisch P, et al. Healing of human intrabony defects following regenerative periodontal therapy with a bovine-derived xenograft and guided tissue regeneration. *Clin Oral Investig.* 2004;8:70-74.

61. Kinane DF, Lappin DF. Immune processes in periodontal disease: a review. *Ann Periodontol.* 2002;7:62-71.

62. Loomer PM, Ellen RP, Tenenbaum HC. Characterization of inhibitory effects of suspected periodontopathogens on osteogenesis in vitro. *Infect Immun.* 1995;63:3287-3296.

63. Cullinan MP, Westerman B, Hamlet SM, et al. A longitudinal study of interleukin-1 gene polymorphisms and periodontal disease in a general adult population. *J Clin Periodontol.* 2001;28:1137-1144.