



UNIVERSITA' POLITECNICA DELLE MARCHE

Facoltà di Medicina e Chirurgia

Corso di Laurea in Odontoiatria e Protesi Dentaria

Presidente: Prof. Maurizio Procaccini

UTILIZZO DELLA COLLA DI FIBRINA

STUDIO CLINICO ED ISTOLOGICO

Relatore: Chiar.mo

Prof. Fabrizio Bambini

Tesi di Laurea di

Ludovica Costanzo

Anno Accademico 2019-2020

INDICE

- **SOMMARIO**

- **INTRODUZIONE**

- 1. PRINCIPI BIOLOGICI DEL TESSUTO OSSEO**

- 1.1 Fisiologia, anatomia e istologia ossea
- 1.2 Caratteristiche macroscopiche del tessuto osseo
- 1.3 Caratteristiche microscopiche del tessuto osseo
- 1.4 Cellule del tessuto osseo
- 1.5 La matrice ossea

- 2. PRINCIPI BIOLOGICI DEL RIMODELLAMENTO OSSEO**

- 2.1 Formazione ossea
- 2.2 Riassorbimento osseo

- 3. RIMODELLAMENTO DELL'OSSO ALVEOLARE
NELL'ALVEOLO POST-ESTRATTIVO**

- 3.1 Principi biologici della guarigione dell'alveolo
 - 3.1.1 Fase Emostatica
 - 3.1.2 Fase Infiammatoria
 - 3.1.3 Angiogenesi e
deposizione di matrice
ossea
 - 3.1.4 Modellamento e
rimodellamento tissutale

4. CLASSIFICAZIONE DELLE ATROFIE DELLE OSSA MASCELLARI

5. TECNICHE DI AUMENTO DI CRESTA ORIZZONTALE E VERTICALE

5.1 Ridge preservation

5.2 Ridge augmentation

5.2.1 Alveolar ridge-split expansion technique (RSEP)

5.2.2 Guided Bone Regeneration (GBR)

5.2.3 Autogenous Onlay Block Bone Grafting

5.2.4 Alveolar Distraction Osteogenesis (ADO)

6. MATERIALI PER LA RIGENERAZIONE OSSEA

6.1 Biomateriali

6.1.1 Innesti autologhi

6.1.2 Alloinnesti

6.1.3 Xenoinnesti

6.1.4 Innesti Alloplastici

6.2 Membrane

6.2.1 Membrane riassorbibili

6.2.2 Membrane non riassorbibili

7. FIBRINA SIGILLANTE

7.1 La fibrina sigillante e i biomateriali

- **PARTE SPERIMENTALE**

1. **Introduzione**
2. **Obiettivo**
3. **Materiali e metodi**
4. **Risultati**
5. **Discussione**
6. **Conclusione**

- **BIBLIOGRAFIA**

- **RINGRAZIAMENTI**

SOMMARIO

L'argomento di questa tesi sperimentale riguarda lo studio della fibrina sigillante e delle sue proprietà in combinazione con i biomateriali utilizzati per la rigenerazione ossea dei mascellari che sono andati incontro a processi di riassorbimento.

La tesi è strutturata in tre parti. Nella prima parte vengono riportate l'anatomia, la fisiologia, l'istologia e le varie classificazioni del tessuto osseo, i processi fisiologici di rimodellamento di quest'ultimo e in particolare dell'osso alveolare, in seguito ad estrazione dentaria o a patologia, nonché tutti i vari difetti ossei ad essi associati. Vengono quindi poi approfonditi il processo di guarigione dell'alveolo post-estrattivo, soffermandosi più specificamente sulla cascata coagulativa, e i vari principi di rigenerazione ossea guidata associati ai biomateriali per essa utilizzati.

Nella seconda parte, invece, viene analizzata la fibrina sigillante, oggetto di studio della tesi, nelle sue proprietà biologiche e nelle proprietà che determina sui biomateriali con cui viene utilizzata nella rigenerazione ossea dei mascellari riassorbiti, nonché nel suo protocollo di utilizzo e conservazione.

La terza parte, infine, è la vera e propria parte sperimentale. In particolare, attraverso un *case report* vengono illustrati: l'obiettivo dello studio, i materiali e i metodi, i risultati ottenuti dall'analisi istologica dei prelievi ossei analizzati, e la discussione degli stessi al fine di trarre delle conclusioni che possano essere traslate nella pratica clinica.

INTRODUZIONE

Dopo l'avulsione dell'elemento dentario il riassorbimento della cresta alveolare è una conseguenza inevitabile che si manifesta rapidamente e influenza la possibilità di poter successivamente riabilitare il paziente mediante l'inserimento di impianti. Per questo motivo, nel tempo la ricerca si è focalizzata sullo studio e sullo sviluppo di tecniche di rigenerazione ossea e di biomateriali per riempire e ricostruire i difetti ossei permettendo, in tal modo, la riabilitazione implanto-protetica di quelle zone caratterizzate da gravi atrofie orizzontali e verticali

Nel 1992 l'esperto internazionale dei biomateriali, il professor J. Black, presidente della Society for Biomaterials (USA), propone una nuova definizione di biomateriale definendolo come un "materiale non vivente usato in un dispositivo medico, progettato per interagire con i sistemi biologici". Questa importante affermazione sancisce il passaggio concettuale da una visione passiva ed inerte del biomateriale ad una attiva che presuppone un'interazione temporale con l'organismo condividendone l'evoluzione e il destino. Pertanto, gli studi si sono rivolti all'impiego di materiali cosiddetti "bioattivi" in quanto le interazioni biologiche che si verificano nell'interfaccia osso-biomateriale sono fondamentali per il successo clinico a lungo termine dell'intervento rigenerativo.

Grazie alle sue proprietà emostatiche e adesive, la colla di fibrina è un biomateriale ampiamente utilizzato, negli ultimi decenni, nella maggior parte delle specialità chirurgiche, particolarmente nella chirurgia intraoperatoria, dove viene utilizzata per ridurre la perdita di sangue e il sanguinamento post-operatorio. La fibrina sigillante imita e rinforza la fase finale della cascata coagulativa portando alla formazione di un coagulo supplementare che si va ad aggiungere a quello fisiologico del paziente.

La miscelazione di fibrinogeno e trombina porta alla formazione della fibrina, impalcatura naturale che fornisce la matrice iniziale utile per l'adesione, la migrazione, la proliferazione e la differenziazione delle cellule. Ultimamente, l'impiego della colla di fibrina umana (FG) associata a biomateriali, visti i suoi

notevoli vantaggi, si sta espandendo sempre di più anche in ambito odontoiatrico, per aumentare le proprietà osteoconduttive e osteoinduttive dell'innesto.

L'obiettivo di questa tesi sperimentale è stato proprio quello di compiere una revisione della letteratura presente riguardo le interazioni tra l'FG e i biomateriali nei difetti ossei, e studiarne le sue caratteristiche come *scaffold* per le cellule dell'osso grazie alla sua biocompatibilità, degradazione biologica e proprietà di attrazione cellulare.

In particolare, è stato condotto un caso clinico con lo scopo di valutare l'efficacia dell'uso combinato di colla di fibrina e di osso cortico-spongioso suino collagenato, in associazione all'uso di membrana in collagene, per l'incremento verticale di osso alveolare in creste atrofiche.

1. PRINCIPI BIOLOGICI DEL TESSUTO OSSEO

L'osso è un tessuto biologico dinamico composto da cellule metabolicamente attive integrate in una rigida struttura riccamente vascolarizzata. Il potenziale di adattamento del tessuto osseo è influenzato da una varietà di stimoli fisiologici, biochimici, biomeccanici e ormonali, nonché da insulti patologici. Una continua attività di modellamento appositivo mediante deposizione ossea o demolitivo con riassorbimento oppure di rimodellamento, che consente al tessuto osseo di adattarsi agli stimoli a cui viene sottoposto, modificando, se necessario, la propria architettura strutturale, favorisce i processi di guarigione, che coinvolgono molteplici tipi di cellule, fattori solubili e differenti compartimenti tissutali.

1.1 *Fisiologia, anatomia e istologia ossea*

Il tessuto osseo fa parte, insieme alla cartilagine, dei tessuti connettivi specializzati per la funzione di protezione e sostegno. Esso origina dal mesenchima come gli altri connettivi, ed è costituito da cellule immerse in una matrice mineralizzata da esse stesse protetta. Circa il 10% in peso del tessuto osseo è costituito da acqua, il resto è composto per il 65-70% da matrice inorganica e per il 30-35% da matrice organica (*Kalfas IH, 2001*). La peculiarità del tessuto osseo è quella di essere calcificato. Nella porzione inorganica della sostanza intercellulare vengono depositati cristalli minerali costituiti prevalentemente da Sali di calcio e fosfato, sotto forma di calcio-idrossiapatite $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, e in quantità minore da carbonato di calcio e altri minerali. All'interno della matrice extracellulare sono disperse fibre organiche altamente ordinate, costituite per il 90% da collagene (di questo, il 97% è di tipo I e il 3% di tipo V) e per la restante parte da numerose proteine non collageniche (osteocalcina, osteonectina, osteopontina, fibronectina, trombospondina, sialoproteine, proteoglicani, biglicani, albumine ed immunoglobuline) e acqua.

La componente cellulare, costituita prevalentemente da osteoblasti, osteoclasti e osteociti rappresenta il 5%.

La presenza di minerale conferisce al tessuto spiccate proprietà meccaniche come durezza e resistenza al carico; la composizione e la distribuzione delle componenti proteiche della matrice, elasticità e resistenza alle fratture. In particolare, il collagene I vanta una *peculiare* struttura terziaria caratterizzata dall'avvolgimento elicoidale di tre catene polipeptidiche uguali in cui sono ripetute sequenze di amminoacidi in genere poco frequenti nelle proteine (prolina, glicina, idrossiprolina e idrossilisina); è proprio tale struttura a conferire le proprietà elastiche alla molecola e quindi all'osso.

Il tessuto osseo, inoltre, rappresenta il principale deposito di ione calcio per le necessità metaboliche dell'intero organismo: la deposizione di calcio nell'osso e la sua mobilizzazione, finemente controllate da meccanismi endocrini, contribuiscono alla regolazione dei livelli plasmatici dello ione. I costituenti minerali della sostanza intercellulare, oltre al calcio, sono rappresentati dal fosforo, sodio e tracce di magnesio, cloro e fluoro.

1.2 Caratteristiche macroscopiche del tessuto osseo

Dal punto di vista macroscopico si distinguono due tipologie di osso: spugnoso (o trabecolare o midollare) e compatto (corticale). L'osso compatto normalmente è situato perifericamente rispetto a quello spugnoso. L'osso spugnoso è adatto a resistere a sollecitazioni di tipo compressivo e per questo si trova principalmente nelle ossa brevi, in quelle piatte e nelle epifisi delle ossa lunghe.

Una delle più comuni classificazioni cliniche del tipo di osso, nel campo dentale, si basa sulle differenti proporzioni relative tra componente corticale e spugnosa a livello delle ossa mascellari (*Lekholm et al., 1985*).

Lekholm & Zarb nel 1985 hanno considerato la qualità ossea sulla base della valutazione radiografica preoperatoria e della percezione soggettiva della resistenza ossea offerta al passaggio della fresa durante la preparazione del sito implantare.

La loro classificazione distingue:

- Osso Tipo 1: osso compatto e omogeneo quasi esclusivamente corticale (tipico della mandibola atrofica e della sinfisi mandibolare).
- Osso Tipo 2: osso corticale compatto con porzione trabecolare densa (tipico del corpo mandibolare).
- Osso Tipo 3: osso corticale sottile con porzione trabecolare densa (tipico della pre-maxilla).
- Osso Tipo 4: osso corticale sottile con porzione trabecolare di bassa densità. (tipico della tuberosità mascellare).

In seguito, Misch ha ulteriormente esteso questa classificazione a tutto il distretto cranio-facciale, basandosi sulle caratteristiche microstrutturali delle due componenti e caratterizzando le quattro classi in base alla percezione tattile del clinico della resistenza incontrata all'atto della fresatura ossea per il posizionamento dell'impianto (*Misch, 1989*), dividendo le tipologie di densità ossea in:

- Tipo D1: osso corticale denso e scarsa spongiosa.
- Tipo D2: osso con corticale spessa e spongiosa a maglie strette.
- Tipo D3: osso con corticale sottile e spongiosa a maglie strette.
- Tipo D4: osso con corticale sottile e spongiosa a maglie larghe.
- Tipo D5: osso immaturo e demineralizzato.

L'osso D1 non si osserva mai nel mascellare mentre è presente nella mandibola a livello della regione sinfisaria, e nei casi di elevata atrofia ossea. È un osso poco indicato per il posizionamento degli impianti e per la fissazione di un innesto poiché ha una scarsa irrorazione ematica che rallenta in maniera significativa la rigenerazione dello stesso; sono inoltre difficoltose le tecniche di preparazione del sito con il sistema classico delle frese, in quanto la densità del tessuto impone l'applicazione di un torque eccessivo cui consegue un surriscaldamento del tessuto osseo con rischio di necrosi.

La densità D2 è quella che si osserva con più frequenza nella mandibola e nel mascellare: rappresenta la qualità ossea ottimale ed è presente nel corpo mandibolare e nella zona frontale del mascellare. La corticale è sufficientemente spessa per garantire una stabilità primaria ai mezzi di fissazione e agli impianti. La buona vascolarizzazione della spongiosa garantisce adeguato sostegno ai fenomeni riparativi ossei.

L'osso di densità D3 è molto comune nel mascellare. Le sue caratteristiche sono paragonabili a quello di classe D2 anche se, rispetto ad esso, presenta una vascolarizzazione della spongiosa inferiore.

L'osso D4, al livello del mascellare, si trova nel 40% dei casi nella porzione posteriore, e solo nel 10% dei casi in quella anteriore, mentre nella mandibola è molto raro. È un osso assai poco denso che scarsamente si addice a qualsiasi terapia chirurgica. La sua corticale è molto sottile e non permette una adeguata stabilità primaria degli impianti inseriti.

Per osso D5 nella classificazione di Misch si intende l'osso immaturo.

Esistono altre classificazioni del tipo di osso che si basano sull'aspetto istologico del tessuto (*Trisi et al., 1999*) o sulla densità ossea valutata su scala Hounsfield derivante dall'analisi delle TC (*Misch, 1989; Norton MR 2001*). I dati TC assegnano ad ogni unità volumetrica (voxel) un valore numerico in base alla densità media dei tessuti in quello specifico volume. Tale valore rientra in una scala standardizzata espressa in Unità Hounsfield (HU) compresa tra il valore -1500 e il valore +2595, con il valore 0 per una densità pari a quella dell'acqua e un valore di circa -1500 corrispondente a quella dell'aria. Le strutture ossee nella scala Hounsfield variano per densità tra +150 e +1500. Le differenze morfostrutturali tra le varie zone dei mascellari sono state esaminate mediante studi anatomici. Questi studi hanno investigato lo spessore e la densità delle trabecole ossee e il volume medio occupato dalle trabecole (MTV, Mean Trabecular Volume). In entrambe le arcate si è riscontrato un gradiente antero-posteriore di MTV, con valori mandibolari costantemente superiori a quelli mascellari. Lo spessore delle trabecole è superiore nella mandibola, mentre nel mascellare superiore vi è una notevole variabilità nella morfologia trabecolare tra le varie regioni. Le differenze morfostrutturali tra le arcate si possono spiegare in termini biomeccanici: la

mandibola è in costante movimento a differenza del mascellare superiore, solidale al cranio, e l'osso mandibolare deve essere più rigido, robusto e possedere una maggiore resistenza alla torsione. L'elevato stress biomeccanico a cui è stata sottoposta la mandibola viene compensato da uno spesso strato corticale basale e da una più densa struttura trabecolare a livello dell'osso spongioso, rispetto al mascellare superiore.

1.3 Caratteristiche microscopiche del tessuto osseo

La struttura spongiforme è caratterizzata dalla presenza di trabecole variamente orientate ed intersecate in una rete tridimensionale, nelle cui cavità è contenuto il midollo osseo. L'osso compatto, invece, deve il nome alla rigidità che lo caratterizza e lo rende resistente alla compressione, tensione e torsione; si trova nelle diafisi delle ossa lunghe e riveste il tessuto spugnoso delle ossa brevi e piatte. Il tessuto osseo, compatto e spugnoso, è costituito dagli stessi elementi cellulari e dalle stesse proteine della matrice e presentano la stessa organizzazione microscopica (organizzazione lamellare) pur svolgendo funzioni strutturali e metaboliche diverse. Le unità strutturali primarie dell'osso lamellare sono gli osteoni, detti anche sistemi di Havers, costituiti da lamelle concentriche sovrapposte, ciascuna delle quali formata da cellule ossee di aspetto dendritico, gli osteociti, disposte ordinatamente nella matrice ricca di fibre collagene, sostanza amorfa (matrice organica) e Sali minerali (matrice inorganica o mineralizzata) intorno ad un canale vascolare, chiamato anche canale di Havers. Intorno vi sono canali più piccoli detti laterali o di Volkmann: nel loro insieme i canali laterali e quelli haversiani formano un sistema continuo di cavità che permette gli scambi tra sangue e cellule ossee.

I prolungamenti citoplasmatici degli osteociti decorrono nella struttura mineralizzata dell'osteone, protetti in canalicoli microscopici e pongono in comunicazione osteociti adiacenti e formano quindi una rete di connessione in grado di trasferire e scambiare le informazioni lungo l'intera struttura ossea. La densità degli osteoni, ossia il grado di compattazione delle strutture lamellari

adiacenti, determina la robustezza meccanica unica dell'osso. Le differenze nella macro-architettura fanno sì che l'osso compatto abbia una densità (massa per unità di volume) molto elevata, circa l'80%-90% e una porosità media del circa il 10%, mentre l'osso spugnoso rappresenta circa il 20% della massa ossea, ma la sua superficie complessiva per unità di volume è circa venti volte superiore a quella dell'osso compatto e la sua porosità è compresa tra il 50 e il 90% (*Buckwalter et al., 1995*). Questi dati indicano che la capacità di effettuare scambi di materiale (cellule, gas, molecole segnale e sostanze nutritive) con circolo ematico sia assai superiore nell'osso spugnoso rispetto all'osso compatto. Nell'osso spugnoso le cellule sono situate tra le lamelle o sulla superficie delle trabecole, in prossimità con i vasi sanguigni midollari, e possono essere direttamente influenzate dalle adiacenti cellule del midollo osseo. Questo fa sì che l'osso spugnoso abbia prevalentemente una funzione metabolica e un turnover medio assai elevati, pari a circa il 25% all'anno, quindi la sua capacità di rinnovamento è notevole, al contrario dell'osso compatto che possiede prevalentemente una funzione meccanica e un turnover circa dieci volte inferiore, pari in media al 2-5% annuo. La struttura dell'osso corticale e di quello spugnoso può variare in risposta all'intensità, alla durata e alla frequenza dei carichi applicati, a stimoli ormonali, a stimoli elettromagnetici, eccetera. In termini meccanici, l'osso compatto, grazie la sua densità, ha un'elevata resistenza alla compressione e alla torsione, mentre l'osso spugnoso ha una robustezza circa venti volte inferiore all'osso corticale, ma è assai più flessibile.

Dal punto di vista istologico l'osso è rivestito esternamente da una lamina connettivale chiamata periostio, assente in corrispondenza delle cartilagini articolari e delle zone di inserzione di tendini e legamenti. Nonostante l'apparente staticità e l'effettiva rigidità, il tessuto osseo è estremamente dinamico: durante le fasi della vita è costantemente soggetto a cicli di riassorbimento e deposizione, mirati a soddisfare le esigenze metaboliche e funzionali dell'accrescimento o ad adeguare la struttura dello scheletro alle sollecitazioni meccaniche cui è sottoposto. L'insieme dei processi di rimozione e formazione di nuovo tessuto è denominato rimodellamento osseo. Ciò si verifica grazie ad una stretta correlazione funzionale

tra le cellule ossee e numerosi i fattori che ne coordinano l'attività, per la regolazione e il mantenimento dell'omeostasi scheletrica.

1.4 Cellule del tessuto osseo

Le cellule del tessuto osseo hanno tutte una derivazione mesenchimale e pur derivando da una stessa cellula progenitrice, hanno sostanziali differenze. Le cellule ossee possono essere suddivise in due grandi categorie: le cellule deputate alla deposizione di matrice ossea, di cui fanno parte le cellule osteoprogenitrici, gli osteoblasti, gli osteociti, e le cellule responsabili del riassorbimento, ovvero gli osteoclasti che derivano da precursori che migrano dal sangue all'osso, i preosteoblasti, i quali a loro volta si differenziano da cellule staminali del midollo osseo emopoietico (*Bani D 2004*).

Le cellule osteoprogenitrici

Le cellule osteoprogenitrici hanno una forma fusata o ovalare, con citoplasma scarso e basofilo e nucleo eucromatico con un grande nucleolo. Le cellule osteoprogenitrici sono cellule mesenchimali pluripotenti che sono localizzate in vicinanza di tutte le superfici ossee, a livello dello strato più interno del periostio, lo strato *osteogenico di Ollier*; quando ricevono uno stimolo appropriato, sono capaci di dividersi, grazie alla produzione e secrezione di fattori di crescita e differenziamento autoctoni, e di produrre una discendenza che si differenzia in osteoblasti (*Rosemberg AE, 1994*). Da questi derivano gli osteociti e le cellule di rivestimento. Questo è un fenomeno vitale per la crescita e la riparazione dell'osso (*Bruder SP, Jaiswal N et al 1998*).

Gli osteoblasti

Gli osteoblasti sono cellule piuttosto voluminose che svolgono un'intensa attività osteogenetica, in quanto producono la matrice organica e regolano la deposizione di quella inorganica, allineandosi sulle superfici della matrice pre-ossea (*Holtrop ME, 1990*).

La deposizione di matrice ossea avviene secondo un ordine ben preciso: dapprima gli osteoblasti tendono a giustapporsi gli uni agli altri creando delle lamine epitelioidi a ridosso delle superfici ossee in via di formazione e ponendo sostanza osteoide dal lato rivolto verso la superficie ossea preesistente; in seguito la matrice viene deposta su tutti i lati andando ad interporsi tra le varie cellule e determinandone il reciproco allontanamento; in tal maniera le cellule si ritrovano interamente circondate da tessuto osteoide e “intrappolate” in esso (McKee MD, Nanci A. 1993). Come già accennato gli osteoblasti producono la matrice organica formata soprattutto da collagene di tipo I e da varie altre proteine non collageniche. Gli osteoblasti producono e secernono fattori solubili, il più studiato dei quali è il *fattore di crescita trasformante (transforming growth factor- β) (TGF- β)* che è un potente stimolatore degli osteoblasti stessi. Esso fa parte della stessa famiglia a cui appartengono le *Bone Morphogenetic Proteins (BMPs)*; agendo in maniera paracrina ed autocrina, è capace di modulare la proliferazione delle cellule osteoprogenitrici, di promuovere il loro differenziamento in osteoblasti e di incrementare il metabolismo e le sintesi di macromolecole da parte degli osteoblasti maturi. Oltre al TGF- β , gli osteoblasti producono gli *insulin-like growth factors (IGFS)*, molecole proteiche strettamente apparentate tra loro con una spiccata azione di stimolo sulla crescita e sul metabolismo cellulare (Bani D, 2004). Gli osteoblasti sono coinvolti anche nei processi di rimaneggiamento osseo. Queste cellule hanno la capacità di attivare indirettamente il riassorbimento della matrice mineralizzata producendo fattori solubili in grado di richiamare gli osteoclasti, cellule deputate a questa funzione; o di attivarla direttamente secernendo enzimi proteolitici in grado di scindere la componente organica della matrice ossea. Tra questi enzimi vi è la *collagenasi*, che viene secreta sotto forma di procollagenasi inattiva. La sua attivazione avviene nell'ambiente extracellulare ad opera di un'altra proteasi, l'attivatore tissutale del plasminogeno (*tPA*), anch'esso prodotto dagli stessi osteoblasti. La collagenasi osteoblastica agirebbe rimuovendo lo strato di tessuto osteoide non mineralizzato che riveste la superficie dell'osso, consentendo così agli osteoclasti di aderire alla matrice mineralizzata e dissolverla (Bani D, 2004).

Nella maggior parte dei casi gli osteoblasti rimangono murati nella sostanza intercellulare da loro deposta e si trasformano in osteociti, ma, in quelli a ridosso delle superfici periostali ed endostali, si trasformano in una membrana di cellule.

Gli osteociti

Gli osteoblasti che a seguito della deposizione della matrice ne rimangono inglobati sono chiamati osteociti; questi hanno un ruolo fondamentale nel mantenimento dell'osso maturo e hanno la capacità di avviarne il rimaneggiamento. Gli osteociti hanno forma stellata, dovuta a numerosi prolungamenti citoplasmatici; il corpo cellulare può avere forma globosa oppure di ellissoide.

Le cellule sono ritenute in cavità scavate nella sostanza intercellulare denominate *lacune ossee*; da queste partono esili canalicoli che contengono i prolungamenti citoplasmatici degli osteociti. I canalicoli di lacune limitrofe sono anastomizzati tra loro; alcuni di essi, inoltre, si aprono sulle superfici vascolarizzate (canali di Havers e spazi midollari) permettendo così scambi metabolici tra le cellule stesse e il torrente ematico, scambi altrimenti resi impossibili dall'elevata densità della matrice. Tra la membrana plasmatica del corpo cellulare e dei prolungamenti e la matrice mineralizzata rimane uno spazio sottile occupato da tessuto osteoide che non mineralizza, di natura glicoproteica; attraverso questo, il liquido interstiziale e le sostanze disciolte (gas respiratori e metaboliti) riescono a raggiungere tutti gli osteociti, anche quelli più distanti dai vasi sanguigni. Le cellule possono permettersi lo scambio reciproco di metaboliti anche grazie alla presenza di giunzioni comunicanti (*gap junction*) tra i prolungamenti di cellule vicine.

Gli osteociti si differenziano dagli osteoblasti, da cui derivano, per la presenza di prolungamenti più numerosi, lunghi e ramificati, una basofilia citoplasmatica appena rilevabile a causa della ridotta attività di sintesi; mentre i granuli enzimatici tipici della fase secretoria (fosfatasi alcalina e pirofosfatasi) sono del tutto assenti. Le dimensioni degli osteociti sono in funzione diretta di quella degli osteoblasti da cui derivano, inoltre la velocità di deposizione ne determina un minore o maggiore volume.

Gli osteociti contenuti nelle lacune possono assumere funzioni diverse secondo necessità, modificando opportunamente la propria struttura. Queste cellule sono

quindi in grado di deporre nuovo tessuto osteoide all'interno della lacuna o di demolirlo, partecipando così alla regolazione dell'omeostasi calcica. Gli osteociti non vanno incontro a mitosi quindi l'aumento di spessore di un segmento osseo si verifica esclusivamente per apposizione e mai di tipo interstiziale (*Sodek J, McKee MD 2000; Rosati P 2006*). Quando giungono al termine del loro ciclo vitale, ritraggono i propri prolungamenti e degenerano.

Gli osteoclasti

L'osteoclasto è una cellula deputata al riassorbimento osseo. Essi non sono cellule autoctone del tessuto osseo, in quanto non appartengono alla linea che deriva dalle cellule osteoprogenitrici. I precursori degli osteoclasti, detti pre osteoclasti, derivano da elementi staminali della serie granulo-monocitaria localizzati nel midollo emopoietico (*Rosemberg AE, 1994*). Rilasciati nel sangue come monociti, andrebbero a costituire una sottopopolazione dei monociti: una parte dei monociti circolanti andrebbe quindi a garantire il turnover degli osteoclasti già differenziati (*Rosati P. 2006*) una volta raggiunti i siti di riassorbimento si fondono formando un sincizio cellulare intimamente associato alla superficie ossea (*Holtrop ME, 1990*) capace di dissolvere la componente minerale e di digerire enzimaticamente le componenti organiche.

Sulle superfici ossee in via di riassorbimento determinano la formazione di cavità di erosione chiamate *fossette di Howship* all'interno delle quali sono raccolti gli osteoclasti attivati. Nell'osso corticale, gli osteoclasti si trovano invece all'apice dei cosiddetti *cutting cones*, strutture coniche costituite da un osteoclasta che procede nello spessore dell'osso riassorbendolo e scavando un tunnel. In questo percorso la cellula è seguita da vicino da un capillare sanguigno e da un gruppo di cellule endoteliali e mesenchimali perivascolari, che possono successivamente differenziarsi in osteoblasti e deporre tessuto osteoide in caso di necessità (*Bani D, 2004*). Particolarmente differenziata risulta la parte della cellula rivolta verso la superficie in via di riassorbimento, dove si rileva il cosiddetto *orletto increspato*, a cui corrispondono numerose ed irregolari invaginazioni del plasmalemma, nelle quali si riscontrano particelle mineralizzate da matrice (*Rosati P, 2006*).

Questo spazio extracellulare viene acidificato dall'osteoclasta mediante un sistema di pompa di ioni idrogeno che solubilizzano il minerale. Il riassorbimento della matrice ossea inizia con la dissoluzione della fase inorganica (cristalli di apatite) dovuta all'acidificazione del microambiente ad opera dell'anidrasi carbonica che sita sul versante intracellulare dell'orletto increspato e genera acido carbonico a partire da CO₂ e H₂O. Nel contempo osteoclasta esocita il contenuto degli enzimi lisosomiali all'esterno: a basso pH, le idrolasi lisosomiali si attivano e digeriscono le componenti organiche della matrice ossea. Inoltre, l'osteoclasta libera l'attivatore tissutale del plasminogeno (tPA), il quale a sua volta attiva la plasmina, che per suo tramite, attiva la collagenasi latente prodotta dagli osteoblasti. Quest'ultimo enzima contribuisce con la sua azione litica alla digestione della sostanza intercellulare organica dell'osso.

Nel loro insieme, più osteoclasti attivati contemporaneamente riescono in un tempo relativamente breve a riassorbire porzioni tissutali anche cospicue (*Bani D, 2004*). Si evidenzia quindi come alla base del processo di riassorbimento ci sia l'adesione dell'osteoclasta alla superficie ossea; questa avviene a seguito di interazioni tra recettori presenti sull'orletto increspato e la matrice ossea.

L'osteoclasta libera inoltre in questo spazio una moltitudine di enzimi che contribuiscono ad attivare fattori di crescita quali le BMP (Bone Morphogenetic Proteins) che hanno molteplici proprietà mitogeniche, chemiotattiche e di stimolo alla differenziazione (*Rengachary SS, 2002*)-. Dunque, mentre l'osso viene ridotto alle sue unità elementari, vengono rilasciate le sostanze che ne iniziano il rinnovamento (*Rosemberg AE, 1994*).

1.5 La Matrice Ossea

La matrice ossea è formata da uno “scaffold” di fibre collagene intrecciate con, all’interno ed in mezzo a questo, piccoli uniformi cristalli di idrossiapatite carbonata. Inoltre, sono presenti altre proteine come i proteoglicani e gli acidi glicosilati e non, che regolano la formazione di fibre collagene e di cristalli o assicurano la continuità tra le componenti della matrice e tra la matrice e le cellule. Inoltre, una piccola quota di carboidrati e lipidi contribuisce a formare la parte organica della matrice che ne costituisce circa un terzo, mentre i restanti due terzi sono formati dalle componenti inorganiche, soprattutto cristalli di calcio e fosfato, HA, che predominano nella fase inorganica (*Sodek J, McKee MD. 2000*).

Collagene

Il collagene costituisce la maggior parte della componente organica (80-90%) del tessuto osseo mineralizzato, il collagene di tipo I è la forma più rappresentata (95%) insieme al tipo V (5%). Il collagene di tipo I forma delle fibre che provvedono alla integrità strutturale di base dei tessuti connettivi. È inoltre presente collagene di tipo III e di tipo XII che è collegato alla resistenza meccanica ed al corretto allineamento delle altre fibre (*Karimbux NY, Rosenblum ND 1992*). Nel tessuto osteoide che viene prodotto durante le prime fasi di riparazione, le fibre sono notevolmente intrecciate, lasciando un notevole volume di spazio interfibrillare che è occupato da cristalli minerali e proteine acide associate. Nell’osso maturo, lamellare, le fibre collagene formano fogli altamente organizzati con piccoli spazi interfibrillari. Sia nell’osso osteoide che in quello lamellare si pensa che i cristalli minerali si formino inizialmente nelle regioni di gap tra le molecole di collagene alle estremità C terminali (*Sodek J. McKee MD 2000*). Dallo strato di tessuto connettivo che avvolge esternamente l’osso, detto periostio, si dipartono spessi fasci di fibre collagene che penetrano all’interno della corticale e si perdono nella sostanza intercellulare: questi fasci costituiscono le fibre perforanti di Sharpey, che ancorano il periostio alla superficie dell’osso (*Bani D, 2004*).

Proteine non collageniche

Alcune di queste proteine come l'osteocalcina e le sialoproteine ossee sono appannaggio dei tessuti mineralizzati, mentre altre come l'osteonectina/SPARC e l'osteopontina hanno una distribuzione più generale. Queste proteine sono associate con la fase minerale. Sono presenti inoltre piccoli proteoglicani, specialmente il condroitinsolfato, associati con la matrice collagenica, sebbene abbiano interazioni anche con i cristalli minerali (*Waltimo J, et al., 1992*). Oltre queste proteine prodotte dalle cellule ossee, altre derivano dal sangue e vengono concentrate nell'osso a causa della loro affinità per i cristalli minerali: albumina, alfa-2hs-glicoproteina, immunoglobuline e proteine GLA (*Delmas PD, Malaval L., 1993*).

- *Proteoglicani* (PG): sono composti da glicosamminoglicani acidi, uniti assieme da brevi catene proteiche.

- L'*osteocalcina* rappresenta circa il 15% delle proteine non collageniche (*Bronkers AL. 1994*). Il ruolo di questa proteina nella formazione e nel rimodellamento osseo non è ancora chiaro, ma si pensa che possa regolare la maturazione minerale, e l'abilità di funzionare come fattore chemiotattico per precursori osteoclasti suggerendo un ruolo anche nel riassorbimento osseo (*Ducy, 1996*). L'osteocalcina è sintetizzata dagli osteoblasti, dopo essere stata rilasciata nello spazio extracellulare, viene non solo assimilata dalla matrice ossea ma anche secreta nella circolazione sanguigna. Di conseguenza, il livello di osteocalcina nel plasma è collegato al tasso del turnover osseo.

- L'*osteonectina* è una glicoproteina che possiede un'alta affinità per il Calcio, sia come ione libero che associato in complessi di tipo cristallino. Sembra che agisca come elemento di enucleazione dei cristalli minerali, in quanto ritenuta capace di concentrare il Calcio nelle sue adiacenze creando così le condizioni per avviare la precipitazione del Fosfato di Calcio.

- La *Fosfatasi Alcalina* (*Waltimo J, et al., 1992*) è invece un enzima capace di idrolizzare i gruppi fosfato legati ai substrati organici, attivo in ambiente alcalino (pH 8-10). Si tratta di un gruppo di glicoproteine di membrana contenenti acido sialico, le cui varie forme molecolari manifestano la stessa attività ma hanno una diversa composizione. Sino ad ora sono stati identificati sette isoenzimi definiti in base alla loro origine: epatico, biliare, pancreatico, osseo, renale, placentare

(riscontrabile in gravidanza), intestinale. In condizioni normali la ALP presente nel siero è costituita dagli isoenzimi provenienti da fegato e tessuto osseo e solo in particolari condizioni fisiopatologiche da quelli intestinale e placentare mentre i rimanenti isoenzimi sono reperibili nel siero solo in condizioni patologiche.

La bALP è una Zn-metalloproteina, attiva solo se in forma dimerica e si trova localizzata sulla membrana esterna degli osteoblasti, ai quali è attaccata tramite un'ancora formata dal fosfatidil-inositolo-glicano. L'isoenzima osseo è prevalente in età infantile, quando la crescita del tessuto è particolarmente spiccata. Oltre che sulla membrana osteoblastica esterna, la bALP è anche presente, e in quantità decisamente superiore, nelle vescicole della matrice ossea, sito iniziale di formazione del cristallo di idrossiapatite: risultando quindi associata ai processi di mineralizzazione dell'osso. Molteplici sono i suoi ruoli nel processo di calcificazione: idrolisi di esteri di fosfati organici con per facilitare la precipitazione di fosfato di calcio, distruzione, tramite la sua attività idrolasica, degli inibitori della crescita fisiologica del cristallo; trasporto del fosfato e, in maniera attiva, del calcio.

- Le *sialoproteine ossee* (BSP) sono rappresentate da la Osteopontina (BSP-1), la BSP-II e la Glicoproteina acida dell'osso (Bag- 75); sono abbondantemente glicosilate e fosforilate, con alti livelli di residui aminoacidi. Questi residui aminoacidici sono implicati nel legame con l'HA.

Si ritiene pertanto che le sialoproteine abbiano la funzione fisiologica di consentire l'adesione delle cellule alla matrice ossea. Si pensa che, la funzione delle sialoproteine sia quella di iniziare la formazione di cristalli minerali; di contro l'osteopontina è un potente inibitore della crescita dei cristalli di HA.

L'espressione delle osteopontina all'interfaccia cellula-matrice fa presupporre un suo ruolo nella adesione delle cellule ossee inclusi gli osteoclasti (*Aubin JE, 1996*).

L'espressione di entrambe queste proteine è aumentata da fattori che stimolano la formazione ossea, come TGFB, suffragando l'ipotesi del ruolo delle sialoproteine nella formazione ossea e del duplice ruolo dell'osteopontina nella formazione e nel riassorbimento osseo (*Sodek J, McKee MD., 2000*); quest'ultima azione sarebbe possibile mediante il legame dell'osteopontina con l'osteocalcina con la formazione di un complesso che potrebbe avere importanza nel reclutamento degli osteoclasti.

- *Altre Proteine*: nel tessuto osseo, infine, è presente una certa quota di proteine provenienti dal plasma come *Albumina*, *Glicoproteina HS*, *Transferrina* ed alcune classi di *Immunoglobuline*.

La matrice minerale

La Componente Minerale o Fase Inorganica è rappresentata da *cristalli di Sali di Calcio*, prevalentemente Fosfato di Calcio a cui si aggiungono quantità minori di Carbonato di Calcio e tracce di altri Sali (Fluoruro di Calcio, Fosfato di Magnesio). Il fosfato di Calcio è presente sotto forma di cristalli di Apatite, la cui cella elementare ha la forma di un prisma esagonale appiattito e formula chimica $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6^{++}$. Le due cariche positive sono di norma neutralizzate dal legame con due ioni ossidrilici (OH^-), formando così l'Idrossiapatite, ma si possono trovare anche altri anioni (ione carbonato nella carbonatoapatite, ione fluoruro nella fluoroapatite), a seconda del pH, del rapporto molare Ca/P e del grado di saturazione della soluzione. Il cristallo si origina dall'impilamento delle singole celle elementari ed ha la forma di un ago lungo e sottile, spesso circa 2 nm e lungo 20-40 nm. I cristalli di apatite tendono a disporsi parallelamente tra loro e tra le microfibrille di collagene, di cui ricoprono la superficie e permeano le porosità.

I meccanismi che portano alla formazione dell'idrossiapatite non sono stati ancora del tutto chiariti. Si suppone che numerosi fattori umorali cellulari ed extracellulari siano essenziali per una fisiologica mineralizzazione di matrice come un appropriato scaffold collagenico, la presenza di ioni Calcio e fosforo, un ambiente basico al quale contribuiscono proteine di matrice anioniche, molecole e macromolecole di matrice, fattori di crescita, enzimi e cellule. Attualmente si ritiene che la mineralizzazione della matrice avvenga in due fasi: la prima consiste nella formazione di piccoli nuclei mineralizzati che si generano per nucleazione eterogenea su una fase substrato, mentre la seconda controlla l'accrescimento dei nuclei stessi. La prima fase è regolata essenzialmente dagli osteoblasti, che stimolano il processo di calcificazione: questo ruolo viene esercitato principalmente attraverso il controllo e l'intermediazione del trasporto di ioni calcio dai vasi alla matrice, con attività cellulari che prevedono il coinvolgimento dei mitocondri. Si rinvencono in sede extracellulare e, poiché al loro interno sono stati riscontrati dei

microcristalli aghiformi, è stata formulata l'ipotesi che possano fungere da primi siti di nucleazione cristallina. Le matrix vesicles rappresenterebbero dunque un ambiente protetto e stabile per la formazione dei primi aggregati minerali e fornirebbero inoltre il supporto enzimatico necessario per la successiva proliferazione dei cristalli nell'ambiente esterno. La deposizione di Sali minerali iniziata a questo livello si propaga quindi nella matrice circostante e si assiste all'accrescimento dei nuclei iniziali fino alla formazione negli spazi interfibrillari delle strutture cristalline aghiformi.

2. PRINCIPI BIOLOGICI DEL RIMODELLAMENTO OSSEO

Il rimodellamento osseo coinvolge le attività coordinate delle cellule dei due gruppi, gli osteoblasti e gli osteoclasti, che rispettivamente formano e riassorbono i tessuti mineralizzati dell'osso. La regolazione del rimodellamento osseo è un processo complesso che coinvolge gli ormoni e i fattori locali, che possono agire in maniera autocrina o paracrina, sulla genesi e l'attività delle cellule ossee differenziate. Va sottolineato il fatto che gli eventi cellulari e molecolari coinvolti nel rimodellamento osseo hanno delle forti somiglianze con molti aspetti dell'infiammazione e dei processi riparativi, e che i rapporti tra le molecole della matrice (come osteopontina sialoproteine ossee, SPARC) la coagulazione ematica e la guarigione delle ferite sono chiaramente evidenti (*J. Sodek, McKee M.D., 2000*).

2.1 *Formazione ossea*

La formazione dell'osso coinvolge la proliferazione e la differenziazione delle cellule staminali dello stroma lungo una via osteogenica che porta allo sviluppo degli osteoblasti. Il processo di differenziazione cellulare è controllato da una cascata di eventi che implica una compartecipazione di programmi geneticamente determinati e l'espressione di geni regolata da vari ormoni, citochine e fattori di crescita.

Le cellule ossee dopo essersi stabilizzate nel sito iniziano ad esprimere collagene I, II e III oltre a fosfatasi alcalina e osteopontina. L'espressione di fosfatasi alcalina e di collagene I sono caratteristiche delle cellule osteogeniche, e la loro sintesi continua a crescere mentre l'espressione di collagene II è persa e quella del III progressivamente diminuita. Negli stadi precoci di differenziazione le cellule mantengono la capacità di intraprendere diverse strade differenziative.

La formazione di un substrato di collagene sembra innescare la differenziazione di cellule pre-osteoblastiche in osteoblasti. Questo stadio probabilmente segue la

condensazione delle cellule mesenchimali. Lo sviluppo degli osteoblasti è indicato dall'espressione delle sialoproteine ossee, che sono collegate con l'inizio della mineralizzazione. L'espressione dell'osteopontina è variabile e generalmente diminuisce prima della differenziazione osteoblastica, e insieme alla osteocalcina è espressa ad alti livelli dopo l'inizio della mineralizzazione. Questi elevati livelli sono mantenuti fino alla differenziazione degli osteoblasti in osteociti e bone-lining cells.

L'espressione dei geni chiamati in causa nei processi di sviluppo e dei fattori di trascrizione che regolano l'espressione di questi geni sembra essere il parametro più utile per definire gli stadi precoci della differenziazione ossea (*J. Sodek, McKee M.D., 2000*). Tra questi abbiamo il "core binding factor $\alpha 1$ ", che è un fattore di trascrizione descritto come potenziale "master gene" per la differenziazione osteogenica, che potrebbe avere un ruolo nella differenziazione cellulare in tutti i tessuti mineralizzati (ad es. in odontoblasti, cementoblasti e ameloblasti).

Regolazione della formazione ossea

La produzione di osso è regolata da fattori che agiscono sia sullo sviluppo di osteoblasti che sulla loro attività. Molti di questi fattori influenzano anche il riassorbimento osseo, direttamente o indirettamente. Così l'ormone paratiroideo, che regola i livelli sierici di calcio stimolando il riassorbimento osseo, può avere effetti anabolici che sembrano essere mediati dal TGF- β e dall'insulin-like growth factor-1. Anche la vitamina D3 ha effetti paradossi sul rimodellamento osseo. Sebbene stimoli il riassorbimento osseo, è anche essenziale per la normale crescita di questo tessuto e per la sua mineralizzazione, avendo una funzione primaria nell'assorbimento del calcio dall'intestino. Questa molecola inoltre stimola fortemente la sintesi di osteocalcina e osteopontina da parte degli osteoblasti mentre sopprime la produzione di collagene. Al contrario l'Insulina e l'ormone della crescita hanno effetti anabolici sull'osso. L'insulina ha come obiettivo diretto gli osteoblasti, stimolando la produzione di matrice ossea e la mineralizzazione e influisce indirettamente sulla formazione di osso stimolando IGF-1 prodotto nel fegato. L'ormone della crescita è richiesto per ottenere una normale massa ossea, e gli effetti anabolici sono apparentemente mediati dalla produzione locale di IGF-1.

Come altri ormoni, gli effetti dei glucocorticoidi sono complicati da effetti secondari che si sviluppano in risposta ai primari. La capacità dei glucocorticoidi di promuovere la differenziazione degli osteoblasti e di stimolare la produzione di matrice ossea è stata chiarita appieno in vitro. In vivo, invece, i trattamenti prolungati con i glucocorticoidi portano a perdita ossea, che può essere attribuita all'aumentata produzione dell'ormone paratiroideo che si ha in risposta agli effetti inibitori dei glucocorticoidi sull'assorbimento di calcio, e forse anche alla deplezione di cellule precursori osteogeniche. Gli ormoni tiroidei e sessuali sono ugualmente necessari per il normale sviluppo delle ossa, e sembrano agire indirettamente su questo processo, attraverso meccanismi ancora poco conosciuti. Gli ormoni tiroidei influiscono sulla ossificazione endocondrale agendo sulla formazione della cartilagine, mentre i meccanismi attraverso i quali gli estrogeni contribuiscono al mantenimento della massa ossea, attraverso effetti anabolici, devono ancora essere chiariti (*J. Sodek, McKee M.D., 2000*). Tra i tanti fattori di crescita e di differenziazione che influenzano la formazione dell'osso, le BMP hanno l'effetto più profondo. Queste citochine possono indurre differenziazione in senso condrogenico e osteogenico nelle cellule mesenchimali indifferenziate, e la loro presenza è richiesta per la genesi di osso endocondrale in siti ectopici. Nonostante ciò le BMP non sembrano avere effetti marcati sulla formazione di matrice ossea. Al contrario il TGF- β può agire come potente inibitore dell'induzione osteogenica operata dalle BMP (*J. Sodek, McKee M.D., 2000*).

Altri potenti agenti anabolici sono gli Insulin-like Growth Factors-1 e -2, che hanno effetti simili al TGF- β sulle proteine della matrice e sulle metalloproteinasi in essa presenti, ma stimolano anche la proliferazione dei precursori osteoblastici (*J. Sodek, McKee M.D., 2000*).

I Fibroblast Growth Factors, che sono caratteristicamente espressi precocemente durante lo sviluppo scheletrico, esercitano i loro effetti sulla formazione di osso principalmente attraverso un aumento della proliferazione delle cellule osteoprogenitrici e la promozione della differenziazione osteogenica (*Canalis E. et al., 1988*).

Il Platelet-derived Growth Factor ha effetti simili al FGF nella promozione dell'osteogenesi, ma influenza anche l'espressione di altre citochine come parte di

un'azione più ampia che questo fattore ha nella guarigione delle ferite e della frattura (*J. Sodek, McKee M.D., 2000*).

2.2 Riassorbimento osseo

Il riassorbimento dei tessuti mineralizzati richiede il reclutamento di cellule specializzate, gli osteoclasti.

Diversi fattori solubili e membrana-associati giocano un ruolo critico nella regolazione della formazione degli osteoclasti, tra questi abbiamo fattori di crescita, ormoni sistemici, e anche cellule del midollo osseo come osteoblasti e cellule midollari stromali (*J. Sodek, McKee M.D. 2000*).

Le interazioni cellulari sono importanti sia per la formazione che per l'attività degli osteoclasti.

Caratteristicamente lo sviluppo degli osteoclasti parte dalla fusione di precursori monociti che avviene nel sito di riassorbimento osseo. Durante questo processo il recettore CD44 è sovra espresso, ed è richiesto affinché la fusione abbia luogo. Insieme al CD44 anche il recettore per l'integrina $\alpha V\beta 3$ è espresso in maniera elevata negli osteoclasti e nei loro precursori, entrambi target primario dell'osteopontina (proteina della matrice ossea) nel generare segnali, promuovere l'adesione cellulare e probabilmente anche la chemiotassi osteoclastica e la migrazione (*Sodek J. et al., 1999*).

A seguito della dissoluzione della fase minerale nell'ambiente acido, gli enzimi lisosomiali possono degradare le macromolecole della matrice, incluso il collagene. Le metalloproteinasi della matrice, che possono essere attivate dalle condizioni acide createsi, sono state osservate nelle lacune di riassorbimento e si pensa contribuiscano alla degradazione della matrice (*Sodek J. et al., 1992*).

Al termine del riassorbimento gli osteoclasti possono andare incontro ad apoptosi, che rappresenta un meccanismo per limitare la loro attività.

Regolazione dell'attività osteoclastica

I fattori primari stimolanti il riassorbimento osseo osteoclastico sono rappresentati dall'ormone paratiroideo, dalla vitamina D3, dell'interleuchina-1 e -6, dal tumor necrosis factor α , e dal transforming growth factor- α . Al contrario la calcitonina, il transforming growth factor β , gli estrogeni e l'interferone- γ inibiscono questo riassorbimento (*J. Sodek, McKee M.D., 2000*). Mentre gli osteoclasti possiedono recettori per la calcitonina e gli estrogeni, così come per la maggior parte delle citochine, la vitamina D3 e l'ormone paratiroideo agiscono su queste cellule indirettamente attraverso i recettori dei pre-osteoblasti, degli osteoblasti e delle lining cells. L'ormone paratiroideo, la vitamina D3, il transforming growth factor- α e le citochine infiammatorie, come l'interleuchina-1 e il tumor necrosis factor- α , promuovono la differenziazione degli osteoclasti (*Reddy S.V., Roodman G.D., 1998*).

Anche i metaboliti dell'acido arachidonico sono importanti modulatori della funzione delle cellule ossee. In particolare, le prostaglandine E possono agire come potenti mediatori del riassorbimento osseo, potendo influenzare anche la formazione. Le prostaglandine esercitano un effetto locale sugli osteoclasti e sui loro precursori, mediando spesso l'azione dei fattori di crescita e delle citochine, come ad esempio l'epidermal growth factor e il TGF- β . Quando somministrate sistemicamente le prostaglandine possono anche stimolare la formazione ossea. L'infusione locale di prostaglandina E2 è stata usata, in vivo, per stimolare l'osso alveolare.

Si pensa che gli estrogeni sopprimano la produzione di citochine inducenti il riassorbimento osseo come l'interleuchina-1 e l'interleuchina-6, mentre il TGF- β e l'interferone- γ inibiscono la proliferazione e la differenziazione dei precursori, già indirizzati, in osteoclasti maturi (*J. Sodek, McKee M.D., 2000*).

La calcitonina è un inibitore particolarmente potente dell'attività osteoclastica, ma i suoi effetti sono transitori, probabilmente a causa della regolazione negativa che subiscono i suoi recettori (*Takahashi S. et al., 1995*).

Questo ormone inibisce la proliferazione e la differenziazione nei precursori osteoclastici, mentre negli osteoclasti maturi causa una contrazione della membrana citoplasmatica e quindi la loro dissociazione in cellule monocitiche.

Oltre a influenzare lo sviluppo degli osteoclasti, l'interleuchina-1 e il $\text{TNF-}\alpha$ ne stimolano anche l'attività. Inoltre, gli effetti della vitamina D3 possono anche essere mediati dalla osteopontina, che è potentemente sovraregolata da questa molecola (*J. Sodek, McKee M.D., 2000*).

3. RIMODELLAMENTO DELL'OSSO ALVEOLARE NELL'ALVEOLO POST-ESTRATTIVO

La comprensione delle varie fasi che conducono alla guarigione di un alveolo post-estrattivo ed al rimodellamento finale della cresta residua, rappresenta un momento di fondamentale importanza nello studio della rigenerazione ossea e di tutte le metodiche da porre in atto al fine di guidare, in modo proficuo, tale processo.

A seguito dell'estrazione di un elemento dentario si susseguono una serie di eventi che, attraverso modifiche dell'architettura del sito post-estrattivo, porteranno ad un graduale riassorbimento delle strutture alveolari.

Indagini cliniche e istologiche in animali e nell'uomo hanno chiaramente dimostrato che il riassorbimento del processo alveolare dopo estrazione dentaria è significativamente maggiore sul versante vestibolare sia nell'osso mascellare che nella mandibola. Inoltre, la riduzione in ampiezza della cresta alveolare è più evidente rispetto alla riduzione in altezza e la perdita ossea maggiore si stabilisce durante il primo mese dall'estrazione dentaria, fase in cui l'osso alveolare propriamente detto (lamina dura) è riassorbito e sostituito da osso non-lamellare. Il riassorbimento si stabilizza dopo circa sei mesi in un intervallo che va da 3 a 5mm circa. In uno studio clinico condotto su 46 pazienti, *Schropp et al.* Rilevarono una diminuzione di ampiezza ossea a 12 mesi dall'estrazione dentaria di oltre il 50%, da 12 a 5.9 mm. È importante specificare che il riassorbimento osseo coinvolge quasi esclusivamente il processo alveolare delle ossa mascellari, mentre l'osso basale non subisce alcuna modificazione sostanziale della propria morfologia. Questo accade perché in esso permangono le inserzioni muscolari che garantiscono un certo trofismo.

3.1 Principi biologici della guarigione dell'alveolo

Le prime 24 ore dopo estrazione dentaria sono caratterizzate dalla formazione del coagulo ematico nell'alveolo. Entro 2-3 giorni il coagulo viene gradualmente sostituito da tessuto di granulazione.

Dopo 4-5 giorni, l'epitelio dai margini dei tessuti molli inizia a proliferare per coprire il tessuto di granulazione nell'alveolo.

Circa una settimana dopo l'estrazione, l'alveolo contiene tessuto di granulazione, tessuto connettivo neo-formato e nella porzione apicale dell'alveolo è in corso la formazione di osteoide.

Dopo 3 settimane, l'alveolo contiene tessuto connettivo, l'osteoide presenta i primi segni di mineralizzazione e l'epitelio ricopre la ferita. Alla 6° settimana di guarigione, la formazione ossea nell'alveolo è ben evidente e si possono osservare le trabecole di tessuto osseo di nuova formazione (*Amler M H, 1969*).

Nel processo di guarigione possiamo individuare importanti eventi: *formazione del coagulo ematico, pulizia della ferita, formazione di tessuto, modellamento e rimodellamento del tessuto.*

3.1.1 Fase emostatica

Immediatamente dopo l'estrazione dentaria, il sangue, proveniente dai vasi sanguigni recisi, riempie la cavità. Le proteine derivate dai vasi e dalle cellule danneggiate danno il via ad una serie di eventi che conducono alla formazione della rete di fibrina. Emostasi, coagulazione e infiammazione sono sempre legati al sistema delle chinine, in modo tale da poter sinergizzare nel processo di riparazione. Il processo emostatico è caratterizzato da quattro fasi consecutive: **fase vascolare, fase piastrinica, fase coagulativa e fase fibrinolitica.**

Ogni fase ha un tempo variabile ma, complessivamente, il processo emostatico si esaurisce nell'arco di 20 minuti da quando si è instaurato il danno. A seguito della fase fibrinolitica abbiamo la riparazione della lesione e quindi la rigenerazione del vaso danneggiato. La tempistica della riparazione è variabile: dipende dal singolo soggetto, dalla risposta infiammatoria scatenata a seguito della lesione vascolare e dalle eventuali complicanze che possono insorgere nei meccanismi riparativi.

Fase vascolare

È il primo evento, caratterizzato dalla contrazione della tonaca media dovuta a stimolazione dei *nerva vasorum*, che hanno determinato, nell'endotelio, un rilascio di una sostanza pleiotropica ad azione vasocostrittiva, l'*endotelina 1*. È un fattore secreto dall'endotelio ad azione paracrina che agisce su recettori della muscolatura liscia e provoca l'attivazione dei filamenti di actina e miosina. La vasocostrizione è utile a ridurre momentaneamente la perdita di sangue perché riduce il lume del vaso e, quindi, l'afflusso di sangue nella zona lesionata.

Fase piastrinica

È caratterizzata dalle piastrine che percepiscono sull'endotelio danneggiato alcune sostanze rilasciate da questo e si attivano per creare il tappo piastrinico, o tappo primario, che dovrà servire ad ostacolare la perdita ematica.

Le piastrine sono cellule anucleate poiché non sono altro che vescicole, derivanti da megacariociti, che vengono rilasciate a livello ematico (tra 100-300 mila unità per mm³) e vivono circa 10-12 gg. Esse contengono granuli α e δ che, a loro volta, contengono diversi mediatori chimici come il fibrinogeno e i fattori di crescita per la componente connettivale (PDGF e TGF β) e rilasciano metaboliti dell'acido arachidonico. La superficie plasmatica delle piastrine è ricoperta da recettori che riconoscono elementi proteici della lamina interna o della membrana basale sulle quali si ancorano le cellule endoteliali e tra cui troviamo: i recettori per il collagene (GP1a e GP2a); il recettore per la fibronectina; il recettore per quasi tutte le componenti della lamina interna; un recettore del collagene, con conformazione diversa dal primo, che prende il nome di trombospondina (recettore a funzione di controllo endogeno del processo coagulativo) e il recettore vWF (fattore per von Willebrand) importante per scatenare il processo coagulativo.

La maggioranza di questi recettori sono delle integrine (molecole di adesione coinvolte nell'adesività, nel rolling e nella diapedesi di un leucocita che attraverso il microcircolo deve attraversare il lume di un vaso e migrare verso il sito del danno).

Contenuto dei granuli piastrinici

La liberazione dei granuli amplifica la fase piastrinica perché nei granuli ci sono sostanze in grado di avere un effetto autocrino e paracrino sulle piastrine. I granuli δ rilasciano, per esocitosi, degli agonisti dell'aggregazione piastrinica tra cui ADP e ioni calcio, fondamentali per la fase piastrinica.

Nei granuli α abbiamo il rilascio di tre grandi classi di molecole:

- Proteine di adesione: fibrinogeno, fibronectina, trombospondina, fattore di Von Willebrand e modulatori della crescita connettivale ed epiteliale (PDGF e TGFB);
- Fattori della coagulazione: fattore 5, proteina S e PAI (inibitore dell'attivatore del plasminogeno);
- HMWK: chininogeno ad alto peso molecolare, implicato nell'attivazione del sistema delle chinine che porta alla formazione della bradichinina e alla liberazione di diverse sostanze che possono interagire sia con la cascata fibrinolitica che con quella coagulativa.

Fasi della risposta piastrinica

La risposta piastrinica può essere suddivisibile in diversi momenti.

1. Prima fase: adesione al sotto endotelio. In seguito ad una lesione dell'intima e alla perdita delle cellule del monostrato endoteliale, rimane esposta, verso il lume del vaso, la regione subendoteliale caratterizzata dalla lamina interna che esprime collagene, fibronectina, ed altre proteine della matrice. La piastrina circolante di piccole dimensioni viene spinta verso la parete del vaso dove, se vi è esfoliazione dell'endotelio, aderisce alla parete del vaso per la presenza di recettori della matrice.
2. Seconda fase: in seguito all'adesione avviene il riconoscimento proteina della matrice-recettore piastrinico che determina un signalling all'interno della piastrina con l'innescò di una via di trasduzione del segnale. Questa prevede un segnale rivolto al citoscheletro piastrinico che porta ad un

cambiamento di forma della piastrina (*shape change*), la quale da struttura discoidale assume una struttura stellata. Ogni estroflessione della piastrina non è altro che l'emissione di uno pseudopodo che serve per entrare in contatto con una regione specifica. Il cambio di forma migliora l'interazione tra le cellule poiché l'interconnessione diventa più ampia. Lo *shape change* rappresenta anche una modalità di contrazione del volume citoplasmatico che facilita il processo di secrezione per esocitosi dei granuli.

3. Terza fase: segue la fase di secrezione dei granuli α e δ con rilascio di mediatori chimici dell'aggregazione che amplificano il segnale aggregativo, rivolto non solo alle piastrine già adese ma anche a quelle che, circolando, stanno migrando verso il punto di lesione.
4. Quarta fase: le piastrine, migranti verso il punto di lesione, riconoscono i mediatori e precipitano nel punto dove è avvenuta l'aggregazione piastrinica, creando su questo un tappo piastrinico caratterizzato da piastrine di forma stellata aggregate l'una sull'altra.

Importante è l'ADP (nei granuli δ) che è un attivatore piastrinico che viene eliminato per esocitosi. La sua liberazione è dovuta ad un signalling mediato dal recettore del collagene che attiva alcuni mediatori secondari (IP3 e proteinchinasi C) che, in seguito al rilascio di calcio e alla fosforilazione, promuovono l'esocitosi di granuli δ , che liberano ADP. Una volta rilasciato, l'ADP ha un ruolo autocrino sulla piastrina perché viene riconosciuto da classi enzimatiche espresse sulla membrana della piastrina stessa, come per esempio la fosfolipasi A2. Quest'ultimo è l'enzima iniziante la cascata dell'acido arachidonico, generando l'acido arachidonico e il PAF. L'acido arachidonico viene successivamente metabolizzato dalla catena enzimatica presente sulle piastrine, soprattutto dalla via della ciclossigenasi. Questa porta alla creazione di una classe di molecole all'interno della piastrina come il trombossano A2 (TXA2), forte attivante piastrinico che agisce attraverso una via di trasduzione autocrina nel potenziare la trasduzione del segnale biochimico, che porta allo *shape change* e alla degranulazione di altre

piastrine. Il trombassano viene liberato dalle celle piastriniche adese e va a targhettare altre piastrine migranti nell'intorno del punto di lesione.

Un elemento fondamentale contenuto nei granuli α è il fibrinogeno. Esso, una volta rilasciato, viene riconosciuto da un recettore espresso sulle piastrine che hanno subito lo shape change : il sito di legame del fibrinogeno viene esposto in modo più efficace dalla creazione dello pseudopodio. Il fibrinogeno ha più siti di legame per diversi recettori. Uno dei monomeri viene riconosciuto dal recettore espresso su una piastrina, mentre un altro monomero può essere riconosciuto in trans da un recettore su di un'altra piastrina. Questo fa sì che due piastrine vicine, esprimenti il recettore, possano stabilizzare la loro vicinanza grazie ad un ponte molecolare formato da fibrinogeno e dal recettore espresso dalla singola piastrina. L'aggregazione piastrinica, quindi, si stabilizza perché il fibrinogeno, rilasciato dai granuli α , si pone a ponte tra il recettore di una piastrina e lo stesso recettore di un'altra. In questa fase il fibrinogeno rappresenta il collante dell'aggregazione piastrinica.

Gli agonisti dell'aggregazione piastrinica sono: il collagene, il Trombossano A₂, l'ADP, il PAF, l'adrenalina (soprattutto attraverso il recettore α), la vasopressina (ADH, prodotto dal nucleo sopraottico e paraventricolare e rilasciato dalla neuroipofisi tramite il controllo neuronale), la serotonina, la prostaglandina H₂ e la trombina, importante sia per stimolare il processo piastrinico sia per determinare la formazione della fibrina.

Le sostanze che ostacolano l'adesività e l'aggregazione piastrinica vengono definiti antagonisti funzionali o antiaggreganti endogeni e sono: la prostaciclina, l'ossido nitrico, l'adenosina, l'attivazione del recettore β -adrenergico e la prostaglandina D₂.

L'equilibrio tra rilascio e produzione di agonisti e di antagonisti è la macchina che regola la formazione del tappo emostatico primario.

Fase coagulativa

Questa fase porta alla formazione di un coagulo di fibrina, cioè di una proteina che agirà come solidificante del tappo piastrinico, o tappo secondario, intercalandosi tra le cellule piastriniche. I fattori della coagulazione che rappresentano la fase coagulativa sono tutti delle serin proteasi circolanti che in forma inattiva vengono

chiamati zimogeni. Le serin proteasi vengono attivate a cascata fino alla formazione della fibrina che viene formata a partire da un precursore circolante, il fibrinogeno. Dal fibrinogeno, che non è una serin proteasi, oltre alla fibrina, si creano anche frammenti più piccoli: i fibrino-peptidi. Poiché il fenomeno della cascata coagulativa deve essere finemente regolato, in modo tale da evitare fenomeni di coagulazione spontanea, una delle modalità di controllo della cascata coagulativa è creare un fenomeno opposto che si attua alla fine della cascata, cioè la cascata fibrinolitica. Essa ha un meccanismo di controllo interno che regola i singoli momenti di attivazione di ogni serin proteasi grazie ad inibitori endogeni.

Inoltre, avviene un controllo ulteriore che è di tipo spaziale: ossia il sistema della coagulazione, affinché si attui, deve organizzarsi su una fase solida, cioè ci deve essere un supporto sul quale si ancorano le serin proteasi attivate e grazie al quale riescano a svolgere la propria funzione, in modo da poter determinare l'evoluzione della cascata enzimatica.

Cascata coagulativa

È necessaria la presenza della fibrina per saldare il tappo piastrinico. Essa nasce dal fibrinogeno, proteina di sintesi epatica, presente nel plasma in forma inattiva, che viene trasformata in fibrina e fibrino-peptidi attraverso l'azione di uno zimogeno, fattore II della coagulazione o meglio noto come protrombina. Questo, per poter frammentare il fibrinogeno in fibrina, deve trovarsi in forma attiva dal punto di vista enzimatico: la forma attiva della protrombina è la trombina o fattore IIa. Per cui la protrombina è il fattore II mentre la trombina è il fattore IIa. L'attivazione della protrombina in trombina avviene da parte di un'altra serin proteasi, chiamata fattore Xa che a sua volta viene attivato tramite una scissione dalla frammentazione di un precursore, il fattore X. Quindi il fattore X si trasforma in Xa, il quale a sua volta trasforma la protrombina in trombina che a sua volta trasforma il fibrinogeno in fibrina. Ciò rappresenta la via comune della coagulazione, la modalità più importante per avere un coagulo, cioè un elemento (fibrina) in grado di sigillare il tappo piastrinico primario. La via comune può essere attivata con due modalità differenti, ovvero il fattore X può essere scisso in due modi: via intrinseca e via estrinseca. La terminologia intrinseca ed estrinseca sottolinea che l'attivazione del

fattore X in Xa avviene da parte di altri componenti del sangue (intrinseca) e da elementi al di fuori del sangue (estrinseca). La terminologia intrinseca ed estrinseca sottolinea che l'attivazione del fattore X in Xa avviene da parte di altri componenti del sangue (intrinseca) e da elementi al di fuori del sangue (estrinseca).

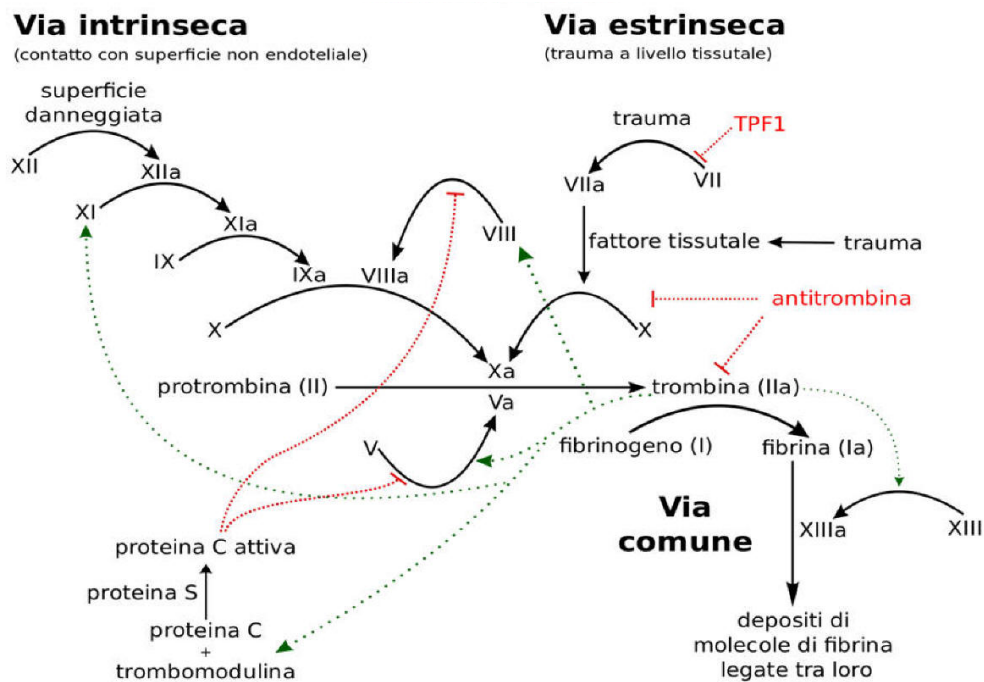


Figura.1 Schema di attivazione della via comune della cascata coagulativa

Via intrinseca

La via intrinseca deve portare alla frammentazione del fattore X in Xa. Ciò può avvenire con la presenza di una superficie ancorante carica negativamente, ovvero la cellula piastrinica che ha fatto lo shape change, dove lo pseudopodo rappresenta quel braccio di superficie della membrana al quale si possono ancorare le proteine. Questa superficie negativa viene riconosciuta dal primo elemento scatenante la via intrinseca della coagulazione, fattore XII o fattore Hageman, che presenta una porzione positiva (NH terminale). Il fattore XII, aderendo sulla superficie della piastrina, si attiva e diventa fattore XIIa, cambiando conformazione ed esponendo il sito catalitico non verso la superficie negativa ma verso l'ambiente controlaterale. Questo fattore XIIa rappresenta l'enzima che taglia il fattore successivo della

coagulazione, il fattore XI, trasformandolo in fattore XIa. L'XIa riconosce il fattore IX della coagulazione e lo trasforma in fattore IXa. Il fattore IX poi trasforma, attivandolo, il fattore X in Xa. Qui si esaurisce la via intrinseca.

Via estrinseca

La via estrinseca parte da una superficie carica negativamente, rappresentata dalla superficie di un endotelio, che deve esporre un elemento chiamato TF (fattore tissutale o tromboplastina tissutale). Questo fattore tissutale, una volta esposto sulla membrana plasmatica di una cellula endoteliale o una volta che è assemblato ad un frammento necrotico della membrana endoteliale, riconosce un fattore della coagulazione, fattore VII, lo ancora su questa struttura, si crea un complesso, superficie dell'endotelio - fattore tissutale - fattore VII, e trasforma tagliandolo il fattore VII in fattore VIIa. Il VIIa può attivare il fattore V in Va (*cross linking* con la via intrinseca attraverso il IX) e il fattore X in Xa. Mentre la via intrinseca dipende solo dalle piastrine, la via estrinseca dipende dalle cellule endoteliali, dall'eventuale necrosi delle cellule endoteliali e può in maniera massiva amplificare la cascata coagulativa perché inficia anche sulla funzione della via intrinseca, stimolando la fase successiva che è la via comune.

Nella via intrinseca come nell'estrinseca ci sono fenomeni di controllo endogeno, cioè la possibilità che il fattore attivato possa, da una parte, promuovere la cascata coagulativa e, dall'altra, creare degli inibitori endogeni che controllino finemente il singolo processo coagulativo. Gli inibitori endogeni impediscono al fattore attivato di proseguire la cascata coagulativa. I fattori endogeni spesso nascono da proteine attivate della stessa cascata coagulativa.

Anche la via comune della coagulazione necessita una superficie di fosfolipidi dove il fattore Xa si ancora, per la presenza anche di ioni calcio, e trasforma la protrombina in trombina e il fibrinogeno in fibrina.

La **trombina** è un grande regolatore e amplificatore della cascata coagulativa perché è una di quelle proteine che da una parte perpetua la via comune (trasforma il fibrinogeno in fibrina), dall'altra rappresenta la molecola che svolge i fenomeni

da feedback positivo (può attivare il fattore V che autoamplifica la cascata della via coagulativa sia a livello della via intrinseca che a livello della via comune). La trombina entra anche in gioco nella capacità di attivare il sistema fibrinolitico, proprio a sottolineare questa sua capacità di multi-regolatore dei fenomeni coagulativi.

Essa riconosce nel **fibrinogeno**, una sostanza particolare la cui scissione crea fibrinopeptidi e un monomero semplice, la fibrina. Il fibrinogeno è formato da 3 catene ed è disposto come eterodimero. Quando taglia questi fibrino-peptidi si forma un unico monomero chiamato fibrina.

La fibrina, una volta generata come monomero, si assembla con più monomeri formando un multimer, come se fossero pezzi di un puzzle. Per creare il polimero stabile di fibrina è necessario che si attivi un'altra proteina della coagulazione, il fattore XIII. Il fattore XIII catalizza il legame covalente tra i monomeri di fibrina, rendendo stabile il polimero. L'attivazione del fattore XIII in XIIIa è promosso dalla trombina. La trombina trasforma il fibrinogeno in monomeri di fibrina e a sua volta trasforma il fattore XIII in XIIIa, il quale riconosce la fibrina instabile e la incolla l'una sull'altra, creando un polimero stabile di fibrina. Il polimero di fibrina stabile incolla il tappo emostatico formando il tappo emostatico secondario.

Fase fibrinolitica

In seguito alla cascata coagulativa, durante la fase fibrinolitica, avviene l'attivazione del sistema fibrinolitico da parte della trombina.

All'interno della cascata coagulativa troviamo inattivatori delle proteasi e dei cofattori. Ricordiamo, tra gli inibitori fisiologici, l'antitrombina III, che agisce in più punti: sul fattore di Hageman attivato, sul fattore XI e sulla trombina. Dall'altra parte ce ne sono altri, come per esempio la proteina C e la proteina S.

Sistema fibrinolitico

L'obiettivo è quello di rimuovere, in modo controllato, il tappo emostatico che ha due funzioni: bloccare la perdita emorragica e stimolare la chiusura di una ferita. La cascata fibrinolitica nasce dall'interno del vaso verso l'esterno e si muove in direzione opposta alla cascata coagulativa (dal fondo della lesione verso l'interno

del lume). La durata totale del processo coagulativo e della fibrinolisi è di circa mezz'ora. Il sistema fibrinolitico sfalda il tappo emostatico secondario distruggendo la fibrina. Per fare ciò crea una proteasi specifica che prende il polimero stabile di fibrina e lo frammenta in più pezzi, creando dei prodotti di degradazione della fibrina. Questa proteasi prende il nome di plasmina che a sua volta deriva da una proteina endogena inattiva di maggiori dimensioni chiamata plasminogeno. Quando il primo livello è stato degradato si passa al secondo livello e si scava la fibrina a più strati. La fibrinolisi è attivata dalle proteine coinvolte nella cascata coagulativa. Ciò può avvenire in modo diretto o indiretto. Anche la fibrinolisi ha degli inibitori endogeni, come per esempio il PAI (inibitore dell'attivatore del plasminogeno) e delle molecole inibitrici della plasmina, che una volta prodotta può avere una incapacità di funzionare per competizione diretta del legame con questi inibitori.

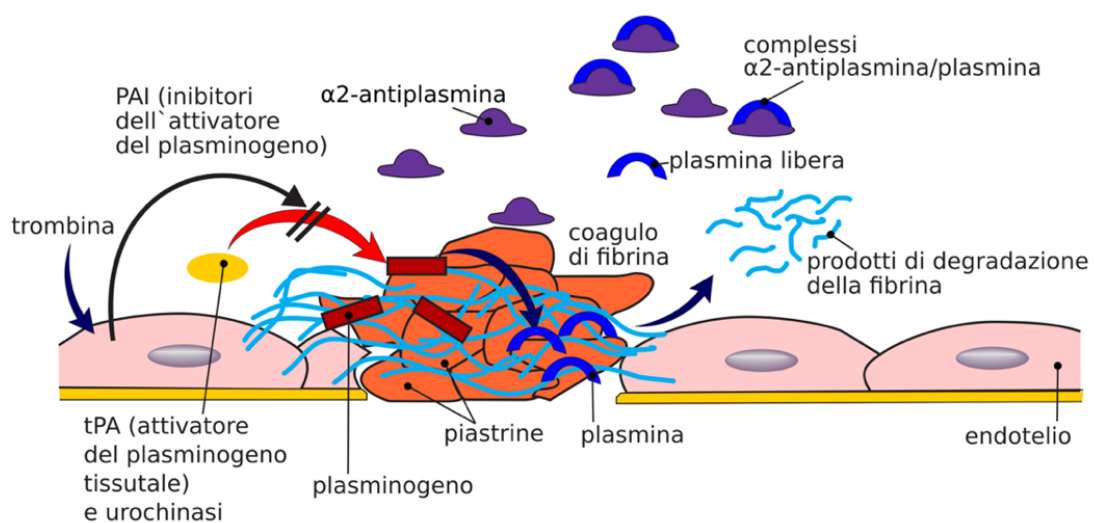


Figura.2 Lisi del coagulo fibrinico ad opera del sistema fibrinolitico

3.1.2 Fase infiammatoria

I neutrofili e i macrofagi migrano nella ferita, fagocitano batteri e tessuto danneggiato e ripuliscono il sito prima che la formazione di nuovo tessuto possa cominciare. I neutrofili penetrano nella ferita più precocemente di quanto facciano i macrofagi. Questi ultimi non hanno solo il compito di ripulire la ferita ma rilasciano anche fattori di crescita e citochine che promuovono ulteriormente migrazione, proliferazione e differenziazione delle cellule mesenchimali. Dopo che i detriti sono stati rimossi e la ferita “sterilizzata”, i neutrofili vanno incontro ad un processo di morte cellulare programmata (apoptosi) e sono quindi rimossi dal sito grazie all’azione dei macrofagi.

3.1.3 Angiogenesi e deposizione di matrice ossea

In questa fase, penetrano nell’alveolo strutture vascolari (dai residui del legamento parodontale) così come cellule mesenchimali fibroblasto-simili (da residui del legamento parodontale e dall’osso circostante). Le cellule mesenchimali cominciano a proliferare e a depositare componenti della matrice nello spazio extracellulare; un nuovo tessuto, il tessuto di granulazione, sostituirà gradualmente il coagulo ematico. Il tessuto di granulazione alla fine contiene macrofagi e un grande numero di cellule fibroblasto-simili, così come moltissimi vasi sanguigni di nuova formazione. Le cellule fibroblasto-simili continuano a rilasciare fattori di crescita, a proliferare e a depositare una nuova matrice extracellulare che guida la crescita di ulteriori cellule e permette l’ulteriore differenziamento del tessuto. I vasi sanguigni di nuova formazione garantiscono l’apporto di ossigeno e nutrienti che sono necessari, dato il crescente numero di cellule che si verifica nel nuovo tessuto. Il processo di intensa sintesi mostrato dalle cellule mesenchimali è chiamato fibroplasia, mentre la formazione di nuovi vasi è chiamato angiogenesi. Attraverso la combinazione di questi due processi viene a formarsi un tessuto connettivo provvisorio.

Il passaggio da connettivo a tessuto osseo avviene lungo le strutture vascolari. Le cellule osteoprogenitrici (es. i periciti), quindi, migrano e si riuniscono in prossimità dei vasi. Si differenziano gli osteoblasti che producono una matrice di fibre

collagene, che assumono l'aspetto "intrecciato", l'osteoides. La mineralizzazione inizia all'interno dell'osteoides. Gli osteoblasti continuano a depositare osteoides e occasionalmente tali cellule rimangono bloccate all'interno della matrice e diventano osteociti. Questo nuovo osso è chiamato osso non lamellare. L'osso non lamellare è la prima tipologia di osso ad essere formata ed è caratterizzata da rapida deposizione come estroflessioni a dito di guanto lungo il decorso dei vasi, da una matrice collagene poco organizzata, da un grande numero di osteoblasti "intrappolati" nella matrice mineralizzata e dalla sua bassa capacità di resistenza al carico. Le trabecole dell'osso non lamellare vengono modellate attorno ai vasi sanguigni. Con l'intrappolamento degli osteociti nel tessuto osseo viene a formarsi il primo gruppo di osteoni, gli osteoni primari. L'osso non lamellare è talvolta rinforzato dalla deposizione del cosiddetto osso a fibre parallele, che vede le proprie fibre collagene organizzate concentricamente e non intrecciate. Durante questa fase precoce di guarigione, il tessuto osseo nella parete dell'alveolo (lamina dura) è rimosso e sostituito da osso non lamellare.

3.1.4 Modellamento e rimodellamento tissutale

La formazione ossea iniziale è un processo rapido. Entro poche settimane, l'intero alveolo estrattivo sarà riempito di osso non lamellare o, come viene anche chiamato, spongiosa ossea primaria. L'osso non lamellare offre una struttura stabile (scaffold), una superficie solida, una risorsa di cellule osteoprogenitrici e un ampio supporto sanguigno per le funzioni cellulari e per la mineralizzazione della matrice. L'osso non lamellare con i suoi osteoni primari viene gradualmente sostituito con osso lamellare e midollo osseo. In questo processo, gli osteoni primari sono sostituiti con osteoni secondari. L'osso non lamellare è dapprima riassorbito fino ad un certo livello. Tale livello di riassorbimento stabilirà la cosiddetta linea di inversione, che rappresenta anche il livello a partire dal quale verrà formato nuovo osso con osteoni secondari. Sebbene questo processo di rimodellamento possa cominciare precocemente durante la guarigione dell'alveolo, la sostituzione dell'osso non lamellare con osso lamellare e midollo osseo può impiegare diversi mesi.

Una tappa importante del processo di guarigione dell'alveolo riguarda la formazione di un cappuccio di tessuto duro che chiude l'entrata marginale all'alveolo. Questo cappuccio è inizialmente costituito di osso non lamellare ma è successivamente rimodellato e sostituito da osso lamellare che si porrà in continuo con la lamina corticale alla periferia del sito edentulo. Questo processo è chiamato corticalizzazione.

La ferita adesso è guarita, ma i tessuti nel sito estrattivo continueranno ad adattarsi alle richieste funzionali. Dal momento che non vi è più nessuno stress provocato da forze generate durante la masticazione e altri contatti occlusali, non c'è nessun bisogno di osso mineralizzato nell'area precedentemente occupata dal dente. Perciò, la porzione apicale del cappuccio di tessuto duro si rimodellerà principalmente in midollo. In molti pazienti edentuli, infatti, l'intera cresta alveolare regredirà come risultato di un adattamento continuo alla mancanza di stimoli funzionali.

4. CLASSIFICAZIONE DELLE ATROFIE DELLE OSSA MASCELLARI

Il processo di atrofia è molto poco standardizzabile e i quadri clinici appaiono estremamente variabili per forma ed estensione del deficit.

Diverse classificazioni delle atrofie ossee sono state proposte negli anni, nel tentativo di facilitare il confronto fra i vari casi e di associare alle diverse situazioni anatomiche un opportuno trattamento terapeutico.

Alcune di queste classificazioni si sono incentrate sul parametro della architettura ossea e della densità del tessuto stesso. Altre, invece, hanno privilegiato l'aspetto morfologico.

Tra le prime abbiamo la classificazione di Lekholm & Zarb, quella di Carl E. Misch e quella espressa in unità Hounsfield, di cui abbiamo già precedentemente parlato.

Tra le classificazioni su base morfologica quella di Seibert considera la dimensione spaziale più rilevante per catalogare il difetto.

- Classe I: ipo-alveolia trasversale
- Classe II: ipo-alveolia verticale
- Classe III: ipo-alveolia mista

La classificazione di Seibert non tiene conto di altri criteri (qualità dell'osso residuo, limitanti anatomiche nobili, rapporti scheletrici intermascellari e sede dell'atrofia) che sono fondamentali per scegliere una tecnica ricostruttiva rispetto alle altre.

Si deve a Carl E. Misch e a K. Judy (1985) l'elaborazione di uno schema classificativo delle diverse morfologie ossee che rispecchia le varie fasi temporali del riassorbimento di queste strutture. L'osso disponibile, (OD), viene classificato in base all'altezza e allo spessore/ampiezza.

- Altezza: si misura dalla sommità della cresta edentula al punto di riferimento inviolabile opposto, quale, per esempio, il pavimento del seno mascellare o il canale mandibolare.

- Spessore/ampiezza: è rappresentata dalla distanza tra le due teche ossee (vestibolari e linguali/palatine), misurato a livello della cresta del potenziale sito implantare.

Ad ogni categoria, o divisione, si associano poi, in relazione alle caratteristiche di OD tre parametri che variano di conseguenza: la larghezza del processo alveolare, l'angolo di inserimento dell'impianto rispetto al piano oclusale e il rapporto corona/impianto.

- Larghezza: è rappresentata dalla distanza mesio-distale misurata tra denti o impianti adiacenti all'area atrofica.
- Angolazione: l'asse dell'impianto dovrebbe essere il più possibile sovrapponibile alla direzione del vettore delle forze oclusali che graveranno su di esso. Tale parametro dipende dall'ampiezza della cresta.
- Rapporto corona/impianto o Ratio Corona/Impianto(C/I): l'altezza della corona si misura dal piano oclusale o incisale alla sommità della cresta ossea e la lunghezza dell'impianto dalla sommità della cresta all'apice dell'impianto. Quanto maggiore sarà questo rapporto tanto maggiore sarà la forza che verrà applicata all'unità osso- impianto.

Sulla base di questi parametri gli autori identificano quattro divisioni: A, B, C, D.

- Divisione A: OD abbondante in tutte le dimensioni (altezza almeno 12 mm, spessore di almeno 5 mm, larghezza di almeno 5 mm: tale situazione consente un'angolazione fra asse implantare e direzione del vettore delle forze oclusali in quel punto fino a 30 gradi, e il rapporto corona/impianto è mantenuto inferiore ad 1).
- Divisione B: col procedere del riassorbimento osseo, l'ampiezza dell'OD in un primo momento diminuisce a spese della teca ossea vestibolare (riassorbimento in senso centripeto). In questa divisione la cresta ossea è più stretta, ma presenta ancora una quantità di OD sufficiente per l'inserimento

implantare. L'altezza è di almeno 10 mm, lo spessore è compreso tra 2,5-5 mm; la larghezza dovrebbe essere maggiore della divisione A (15 mm richiesti) per assicurare una adeguata interfaccia osso impianto, essendo lo spessore diminuito; l'angolazione massima consentita è di 20 gradi; il rapporto corona-impianto dovrebbe essere tenuto inferiore a 1. È possibile individuare in questa divisione un'ulteriore sottodivisione: Bw (width): in cui lo spessore è compreso tra i 2,5 e 3,5 mm.

- Divisione C: Come abbiamo visto il meccanismo con cui l'osso si riassorbe è prima in spessore e successivamente in altezza. Così, la cresta di divisione B continua a riassorbirsi in spessore e se il processo continua l'OD si riduce poi in altezza. Questo quadro descrive una situazione atrofica da moderata ad avanzata. L'OD nella divisione C è inadeguato in una o più dimensioni. Perciò lo spessore può essere inferiore a 2,5 mm e l'altezza inferiore a 8 mm.

Ci sono 2 sottodivisioni della divisione C:

- Cw (width): quando la cresta residua è inadeguata in ampiezza
 - Ch (height): quando è inadeguata anche in altezza. Quest'ultima categoria denota in genere un livello di riassorbimento maggiore.
- Divisione D: il continuo riassorbimento osseo ha condotto in questa divisione alla completa scomparsa del processo alveolare unitamente ad un'atrofia dell'osso basale. Siamo di fronte a casi di grave atrofia.

La perdita dell'osso basale conduce ad un mascellare superiore completamente piatto o ad una mandibola cosiddetta "a matita".

Nel mascellare superiore si può avere un riassorbimento della spina nasale e del palato sino all'arco zigomatico.

Nella mandibola non è infrequente osservare al nervo mentoniero e porzioni del fascio vasculo-nervoso discendenti; il tubercolo genieno superiore può diventare la struttura anatomica più alta di tutta l'arcata inferiore; il muscolo mentale arriva a perdere molte delle sue inserzioni attaccandosi ormai alla sommità della cresta ossea quindi al di sopra del corpo della mandibola ed infine il muscolo buccinatore e milo- ioideo sono estremamente vicini.

Classificazione di Misch-Judy ('85)

<i>DIVISIONE</i>	<i>CARATTERISTICHE</i>
<i>A</i>	>10-12mm <i>Altezza</i> >5mm <i>Spessore/ampiezza</i> > 5mm <i>Larghezza</i> < 30 Gradi <i>Angolazione massima</i> <i>RATIO C/I < 1</i>
<i>B</i>	>10-12mm <i>Altezza</i> 2,5-5mm <i>Spessore (B)</i> 2,3-3,5 mm <i>Spessore (Bw)</i> >15mm <i>Larghezza</i> < 20 gradi <i>Angolazione</i> <i>RATIO C/I < 1</i>
<i>C</i>	<i>Sfavorevole In:</i> <i>Altezza: CH (Height) < 8mm</i> <i>Spessore: CW (Width) < 2,5mm</i> <i>Larghezza: Angolazione implantare eccessiva</i> (<i>> 30 Gradi in A</i>) (<i>> 20 Gradi in B</i>) <i>RATIO C/I > 1</i>
<i>D</i>	<i>GRAVE ATROFIA: mascellare piatto, mandibola a matita</i>

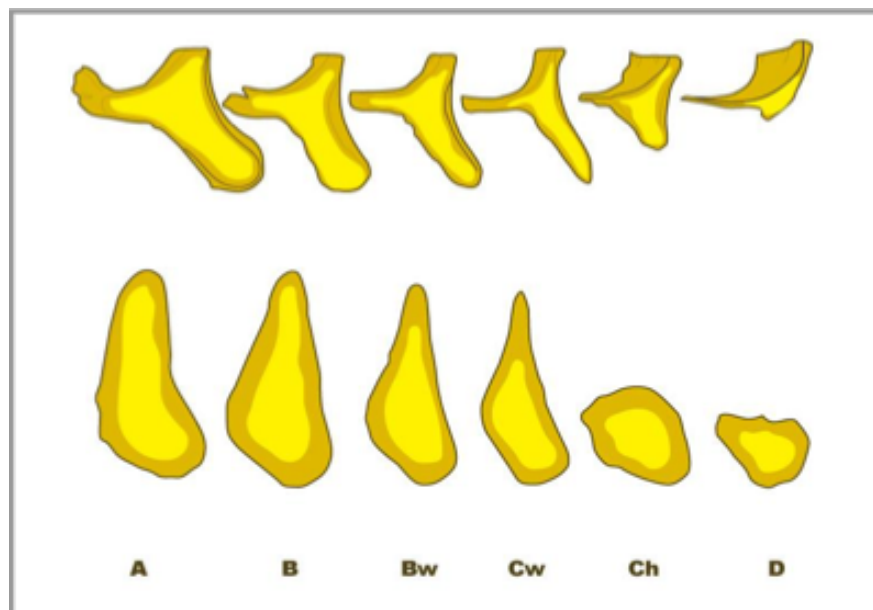


Figura. 3 *Classificazione di Misch-Judy ('85)*

Classificazione di Cawood e Howell ('88)

Tra le varie classificazioni proposte, la più utilizzata è sicuramente la classificazione di Cawood e Howell del 1988. Gli autori hanno analizzato un campione di 300 crani secchi e sono giunti alla conclusione che, nel soggetto edentulo, la morfologia dell'osso basale rimane pressoché inalterata mentre è la componente alveolare a subire una marcata involuzione sia in altezza che in spessore e, inoltre, il riassorbimento segue modelli abbastanza ripetibili. Alla luce di questo studio, gli autori hanno suddiviso i quadri di atrofia in 5 classi per il mascellare superiore e 6 per la mandibola:

- Classe I: dentatura presente;
- Classe II: cresta alveolare post-estrattiva immediata;
- Classe III: cresta alveolare post-estrattiva tardiva con riossificazione dell'alveolo post-estrattivo e processo alveolare arrotondato ma adeguato in altezza e spessore;
- Classe IV: cresta con altezza adeguata ma spessore insufficiente, definita "a lama di coltello";
- Classe V: cresta piatta, inadeguata sia in altezza che spessore;
- Classe VI: (solo per la mandibola) cresta depressa, con atrofia dello stesso osso basale.

Le varie classi si associano a morfologie ossee differenti a seconda della sede (mascellare anteriore o posteriore, mandibola anteriore o posteriore). Inoltre, settori diversi dello stesso mascellare possono presentare simultaneamente differenti classi di atrofia.

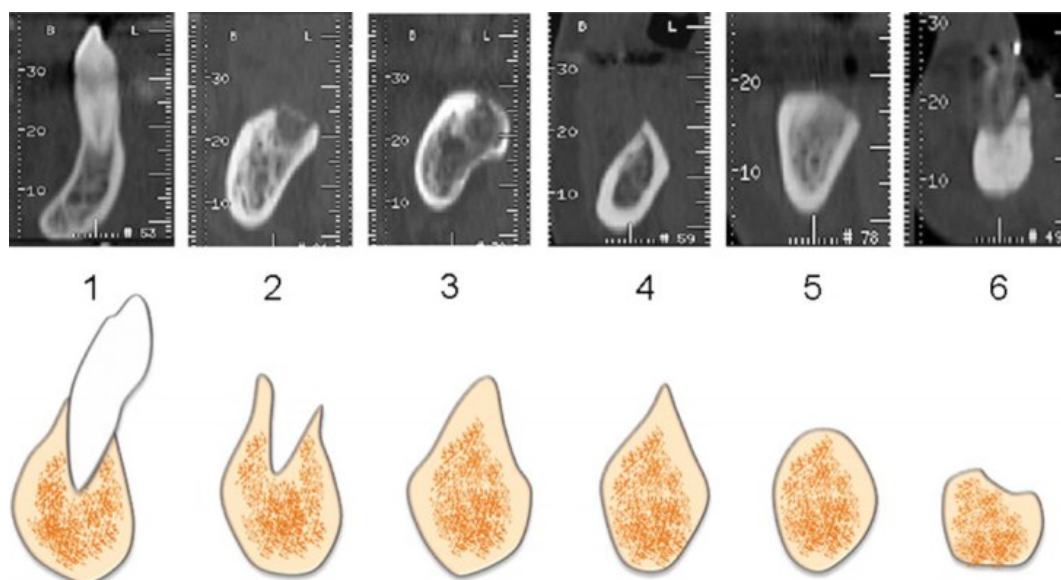
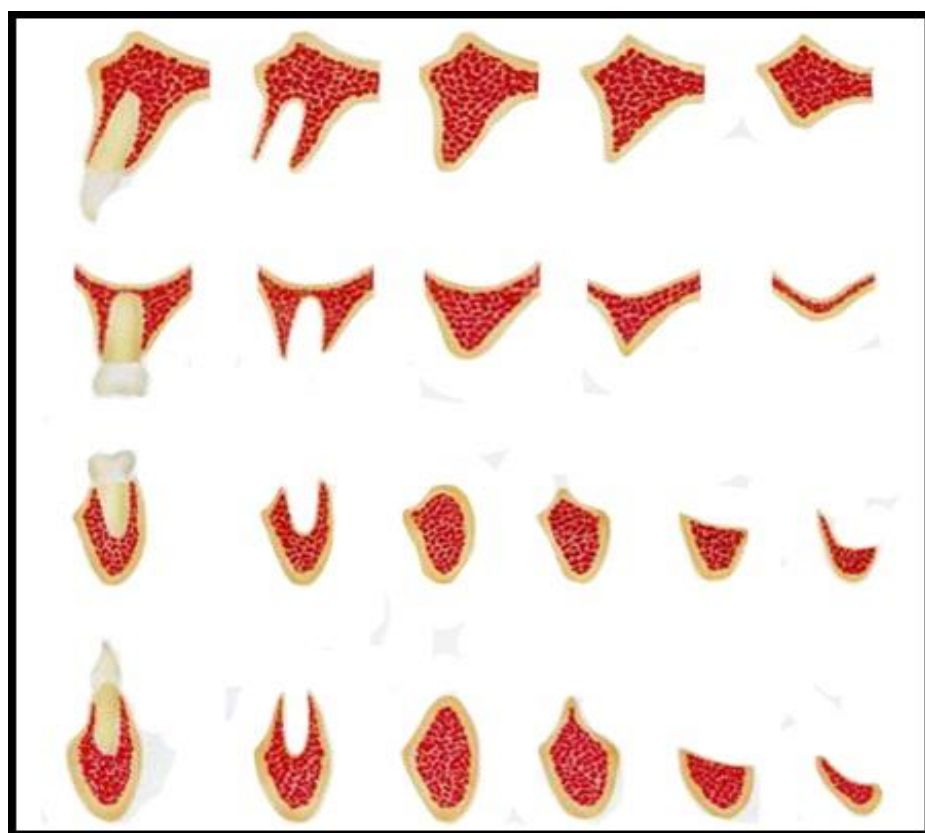


Figura. 4 *Classificazione di Cawood e Howell ('88)*

Classificazione di Misch-von Arx ('98)

Anche la classificazione di Misch-von Arx del 1998 individua quattro classi A, B, C, e D e suddivide la classe C, a sua volta, in due sottoclassi: CH e CW.

<i>CLASSE</i>	<i>AMPIEZZA CRESTA</i>	<i>ALTEZZA CRESTA</i>
<i>A</i>	<i>> 5 mm</i>	<i>Nessun/lieve riassorbimento verticale</i>
<i>B</i>	<i>2,5-5 mm</i>	<i>Nessun/lieve riassorbimento verticale</i>
<i>C</i>	<i>2,5-5mm</i>	<i>Moderato riassorbimento verticale</i>
<i>CH (Height)</i>	<i>> 5 mm</i>	<i>Elevato riassorbimento verticale</i>
<i>CW (Width)</i>	<i>< 2,5 mm</i>	<i>Nessun/lieve riassorbimento verticale</i>
<i>D</i>	<i>> 5 mm</i>	<i>Severa atrofia</i>

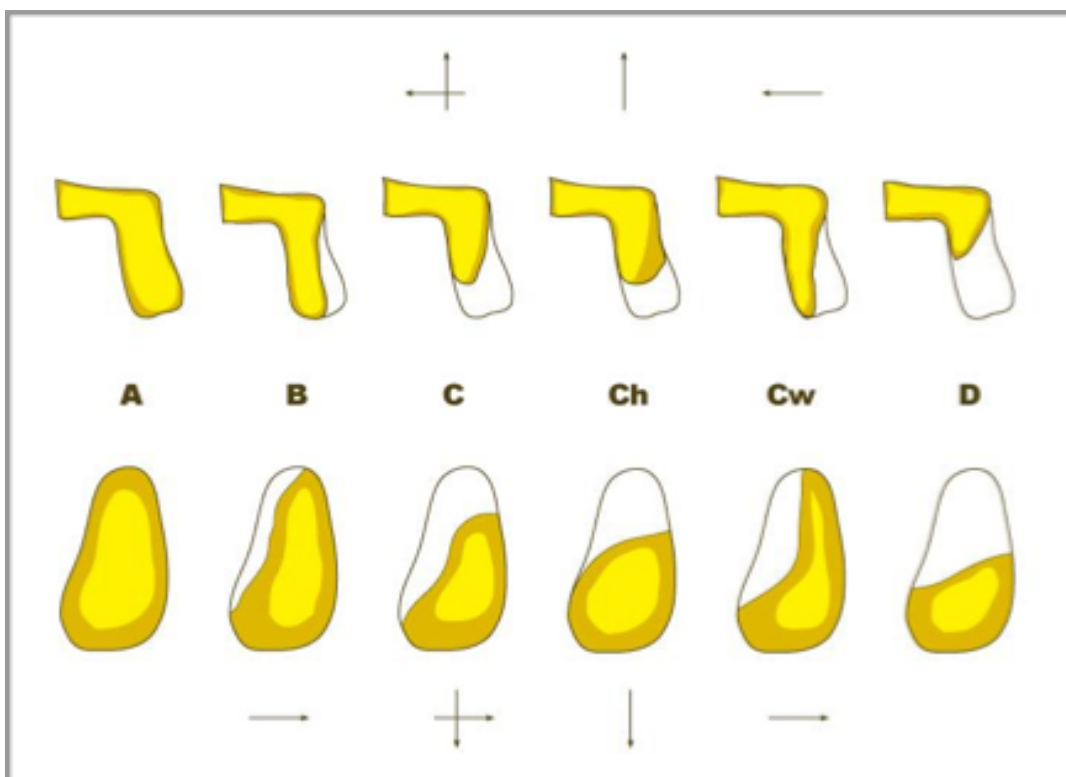


Figura 5. *Classificazione di Misch-von Arx. (1998)*

Classificazione di Chiapasco (2004)

Infine, nel 2004 Chiapasco ha descritto una classificazione delle atrofie del mascellare superiore che tiene conto dell'altezza e spessore delle creste residue e della distanza interarcata, dando indicazioni sull'approccio chirurgico ricostruttivo da seguire.

- Classe A: altezza della cresta residua fra 4 e 8 mm, spessore fino a 5 mm con normale distanza inter-arcata. I protocolli chirurgici consigliati sono l'elevazione del seno con approccio laterale o per via trans-alveolare.
- Classe B: altezza della cresta residua fra 4 e 8 mm, spessore minore di 5 mm con normale distanza interarcata. I protocolli chirurgici consigliati sono: elevazione del seno mascellare con approccio laterale associato a incremento trasversale mediante innesti di apposizione o rigenerazione ossea guidata.
- Classe C: altezza della cresta alveolare residua minore di 4 mm, spessore maggiore o uguale a 5 mm con normale distanza interarcata. Protocollo chirurgico consigliato: elevazione del seno mascellare con approccio laterale.
- Classe D: altezza della cresta alveolare residua minore di 4mm, spessore minore di 5mm con normale distanza inter-arcata. Si consigliano, come protocolli chirurgici, l'elevazione del seno mascellare con approccio laterale associato ad innesti di apposizione sul versante vestibolare e rigenerazione ossea guidata.
- Classe E: stesse caratteristiche della classe A con aumento della distanza interarcata. I protocolli chirurgici consigliati sono: innesti di apposizione verticali o GBR per ripristinare la normale distanza interarcata.
- Classe F: stesse caratteristiche della classe B con aumentata distanza inter- arcata. Protocollo chirurgico consigliato: elevazione del seno mascellare con approccio laterale, se indicato. Si associa la ricostruzione sia verticale che trasversale della cresta residua mediante innesti di apposizione verticali e vestibolari o GBR è da valutare con cautela.
- Classe G: stesse caratteristiche della classe C con aumentata distanza interarcata. I protocolli chirurgici consigliati sono: elevazione del seno con approccio laterale a cui si associano innesti ossei autologhi di apposizione verticali.
- Classe H: stesse caratteristiche della classe D con aumento della distanza interarcata. Protocolli chirurgici consigliati: elevazione del seno con approccio

laterale associata ad innesti ossei autologhi di apposizione verticali e trasversali. La GBR è poco indicata.

Le modalità di riassorbimento sono differenti nel mascellare e nella mandibola: in entrambe le ossa il riassorbimento avviene dal processo alveolare verso l'osso basale. La differente topografia dell'osso basale nel mascellare e nella mandibola, dunque, determina la direzione "apparente" del riassorbimento secondo le seguenti modalità:

- a livello mandibolare assistiamo ad una perdita di volume in senso verticale associata ad un riassorbimento vestibolo-linguale (modalità di riassorbimento centrifugo), che nei casi più gravi determina una superficializzazione del canale mandibolare e a volte addirittura l'esposizione del nervo alveolare inferiore. Tale modalità di riassorbimento provoca, inoltre, un'anterotazione della mandibola.
- nel mascellare superiore, invece, si ha un riassorbimento verticale che determina un avvicinamento della superficie crestale al pavimento delle cavità nasali e al pavimento dei seni mascellari. Tale modalità di riassorbimento è detta centripeta.

5. TECNICHE DI AUMENTO DI CRESTA ORIZZONTALE E VERTICALE

A seconda della tecnica utilizzata, come descritto nell'articolo di Tolstunov et al. (2019), possiamo parlare di preservazione della cresta (RP) o aumento della cresta (RA). Questi due metodi sono progettati per prevenire o correggere la carenza ossea, ovvero mantenere, ricreare o inserire biomateriali necessari per il posizionamento del successivo impianto dentale.

5.1. *Ridge Preservation*

La preservazione di cresta (RP) si realizza con procedure di innesto alveolare che intendono preservare il volume della cresta esistente all'interno del suo involucro osseo; di solito vengono eseguiti al momento dell'estrazione del dente con un innesto di particolato "intarsiato" con l'obiettivo di ridurre al minimo la perdita di tessuto dopo la perdita dei denti. Sebbene la completa prevenzione del collasso osseo con le tecniche RP sia impegnativa, l'obiettivo è ridurre al minimo la perdita volumetrica.

5.2. *Ridge Augmentation*

L'aumento di cresta (RA) viene realizzato utilizzando procedure di innesto di tessuto duro e morbido che intendono aumentare il volume della cresta alveolare oltre l'involucro scheletrico esistente; di solito vengono eseguite nel sito edentulo di una cresta alveolare carente. Questo approccio chirurgico può comportare l'innesto di onlay o inlay e può includere il metodo di distrazione alveolare.

Le tecniche di incremento osseo vengono classificate in **aumento osseo orizzontale (HBA)** e **aumento osseo verticale (VBA)**.

5.2.1 Alveolar Ridge-Split Expansion Technique (RSEP)

La Alveolar ridge-split expansion technique (RSEP) è una tecnica usata per i difetti orizzontali della cresta alveolare mediante la divisione della cresta esistente e la sua espansione per il posizionamento degli impianti dentali. La procedura si basa sull'uso di un innesto interposizionale di materiale particolato che viene inserito in modo intarsiato nella cresta allargata chirurgicamente. I nomi associati a questa procedura sono “espansione”, “allargamento”, “diffusione” e “lembo osteoperiostale”. Questi implicano le specificità della tecnica, un risultato finale della divisione della cresta o il tipo di lembo utilizzato per questa procedura.

Per cui la RSEP è progettata principalmente per l'HBA con l'obiettivo di aumentare la larghezza alveolare attraverso un innesto interposizionale suddividendo la cresta e riposizionando la placca corticale vestibolare.

Questa non è una nuova procedura, infatti, il Dr. W. Bell studiò e documentò la logica delle osteotomie segmentali della mascella alla fine degli anni '60 in base alla loro vitalità attraverso lembi osteoperiostali vascolarizzati. I dott. Simion, Pikos e Scipioni negli anni '90 descrissero i dettagli della “split-crest technique and guided tissue regeneration.”

L'indicazione per la procedura, come menzionato sopra, è la perdita ossea orizzontale di solito dovuta al riassorbimento. Il riassorbimento implica una diminuzione del volume osseo che ha effetto sia sulla corticale che sulla midollare, manifestandosi come una riduzione netta del compartimento trabecolare a causa della perdita della radice dentale e della sua funzione correlata. Questo collasso del piano corticale vestibolare porta ad una ridotta prominente o larghezza buccale della cresta alveolare.

La split crest riposiziona il piano corticale collassato a livello vestibolare, creando spazio intra-alveolare per un particolare innesto. Una divisione effettiva avviene attraverso lo spazio trabecolare. Una cresta da 3 a 5 mm è l'indicazione più comune per la procedura. L'impianto immediato è comunemente usato, sebbene il posizionamento ritardato dell'impianto sia più sicuro e prevedibile. Le immagini di tomografia computerizzata a fascio

conico (CBCT) forniscono al chirurgo un'analisi approfondita dell'anatomia tridimensionale della cresta alveolare prima dell'intervento chirurgico.

Descrizione della tecnica chirurgica

Il lembo che viene riposizionato a livello vestibolare di solito include una placca corticale vestibolare con un po' di osso trabecolare. Pertanto, viene definito lembo osteoperiostale un lembo di tessuto combinato molle-duro che fornisce la vascolarizzazione per il segmento osteotomizzato fratturato. Esistono due modi principali per riposizionare un lembo osteoperiostale vestibolare. Il più comune è la *green-stick outfracture* dell'osso basale con il movimento del segmento vestibolare simile a una cerniera o all'apertura di un libro, da qui la designazione del termine "outfractured alveolar split" o "lembo di libro" ("**book**" flap). Il secondo metodo di scissione alveolare è usato per riposizionare la placca buccale in modo ancora più vestibolare e richiede la separazione della connessione ossea per consentire un avanzamento orizzontale più grande chiamato "**island**" flap.

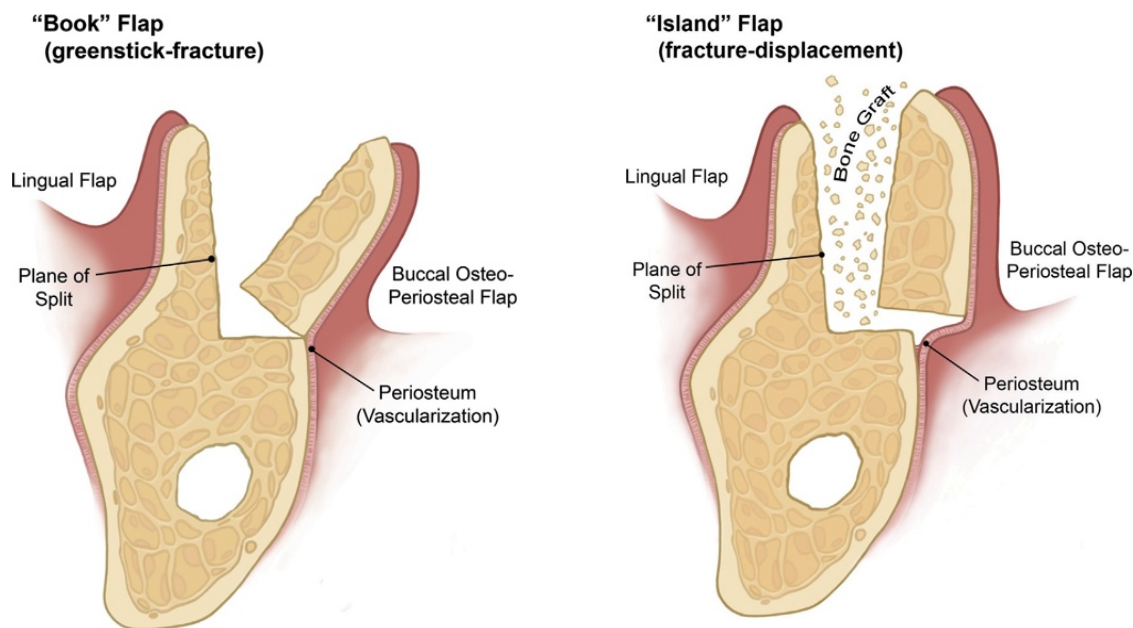


Figura.6 Metodi di riposizionamento vestibolare del lembo osteoperiostale

In entrambi i casi, un innesto particellare di scelta viene quindi posizionato nello spazio creato tra i frammenti ossei corticali riposizionati buccalmente e lingualmente (o palatalmente) come innesto interposizionale.

Questa tecnica è analoga alla procedura RP dopo l'estrazione del dente. In entrambi i casi, si tratta di un innesto di intarsio posizionato all'interno di un alveolo a 3 o 4 pareti o di uno spazio osseo a 2 pareti creato con la procedura di split crest. Pertanto, fisiologicamente, la guarigione ossea dell'innesto di particolare interposizionale è simile e in entrambi i casi avviene attraverso le fonti endostali e periostali di vascolarizzazione. Nella maggior parte dei casi, la chiusura della ferita primaria non è necessaria e la guarigione per seconda intenzione preserva la gengiva attaccata e la profondità del vestibolo.

La mascella e la mandibola sono diverse in termini di rigidità o densità dell'osso. La densità ossea potrebbe non essere importante per un innesto osseo a blocchi fissato sulla sommità della cresta (onlay o innesto esterno) ma è essenziale per l'innesto interno di RSEP. L'osso mandibolare, più denso, è soggetto a fratture rispetto all'osso mascellare che è più malleabile e tende a migliorare con la compressione ossea. Questo è il motivo per cui la RSEP mascellare viene spesso eseguita in un singolo stadio (osteotomia-divisione-espansione-innesto) e la RSEP mandibolare richiede spesso un approccio a due fasi (fase 1: osteotomia; fase 2: divisione-espansione-innesto). Si dice spesso che la “condensazione ossea” si verifica con la RSEP mascellare (simile a un rialzo di seno crestale) e la “mobilizzazione ossea” si verifica con la RSEP mandibolare.

Gli impianti possono essere posizionati contemporaneamente, ma più prevedibilmente vengono posizionati in una fase successiva: a 4 a 6 mesi dopo la guarigione dell'osso aumentato. La RSEP richiede una strumentazione speciale (come qualsiasi tecnica chirurgica) che di solito consiste in una osteotomia con scalpelli affilati o attraverso una strumentazione piezoelettrica. Questi tagli ossei sono anche spesso chiamati corticotomie perché vengono posizionati solo attraverso l'osso corticale.

L'osso mascellare essendo più flessibile per convenzione non richiede molti tagli ossei.

Mandibular Ridge-Split Expansion Procedure

La RSEP mandibolare viene spesso eseguita in due fasi a causa dell'osso più denso. Il primo stadio consiste nella creazione di corticotomie a “finestra” nell'area indicata (simile a una finestra ossea di una procedura di rialzo di seno laterale). Il secondo stadio viene eseguito quattro settimane dopo e consiste nella divisione effettiva lungo le linee della corticotomia, seguita dall'espansione e quindi dall'innesto con materiale di innesto di particolato inserito nello spazio, e seguito da chiusura dopo la rigenerazione guidata dei tessuti (GTR) e posizionamento di una membrana con guarigione per seconda intenzione. La mucosa linguale nella mandibola può in alternativa essere fatta avanzare per chiudere lo “split-gap” usando la chiusura primaria della ferita. Il secondo stadio viene eseguito solo dopo circa quattro settimane per consentire al lembo di tessuto molle mucoperiostale precedentemente riposizionato di guarire e all'osso di fornire un'importante fonte di vascolarizzazione periferica (periostale) per il lembo osteoperiostale creato. Sebbene gli impianti possano essere collocati allo stesso tempo, la stabilità primaria può essere difficile da raggiungere, quindi spesso viene eseguita in una fase separata quattro mesi dopo in una cresta completamente guarita.

Maxillary Ridge-Split Expansion Procedure

La RSEP mascellare può essere vista come una procedura mandibolare semplificata a causa della creazione di una busta ossea più morbida e flessibile grazie alla presenza di osso di tipo 3 e 4. Sebbene occasionalmente venga eseguito un approccio graduale nell'osso più denso, viene spesso utilizzato un approccio a singolo stadio. L'osso morbido di una cresta alveolare mascellare consente la divisione, l'espansione, l'innesto e, talvolta, il posizionamento dell'impianto contemporaneamente. Sono spesso

necessarie solo corticotomie verticali iniziali crestali e piccole per aiutare a propagare la divisione della porzione buccale dell'osso lontano dal palato.

L'uso di osteotomi progressivi porta quindi alla lussazione e alla *greenstick out-fracture* della placca corticale buccale per formare uno spazio o una "cavità" che è riempita con un materiale osseo particolato e coperta con una membrana riassorbibile. Lo strumento piezoelettrico può essere utilizzato anche per un taglio osseo più sottile. La guarigione per seconda intenzione della ferita è preferita.

La RSEP è una procedura sensibile alla tecnica (formazione e abilità sono importanti) che tende ad avere un tasso di successo più elevato nelle creste con una larghezza alveolare da 4 a 5 mm, specialmente nella mascella anteriore e nella mandibola posteriore.

Per migliorare il risultato ed evitare complicazioni, gli autori suggeriscono i seguenti principi chirurgici:

- Addestramento chirurgico adeguato;
- Selezione attenta dei pazienti, evitando i pazienti che fumano o hanno una scarsa igiene orale;
- Utilizzare idealmente da 2 a 3 spazi dentali edentuli per RSEP;
- Selezionare un osso particellare riassorbibile lentamente e mescolarlo con osso autologo e, possibilmente, biomimetici, come la fibrina ricca di piastrine (PRF) o colla di fibrina;
- Correzione eccessiva allargando la cresta fino a 10 mm o più in previsione del rimodellamento osseo;
- Utilizzare un approccio graduale con inserimento dell'impianto ritardato anziché immediato;
- Selezionare impianti conici e di diametro inferiore (ma più lunghi) con buona stabilità primaria dell'impianto;
- Prestare attenzione alla conservazione del tessuto gengivale vestibolare. L'innesto di tessuto molle è facoltativo in caso di insufficienza della gengiva cheratinizzata sull'aspetto vestibolare della cresta.

5.2.2 Guided Bone Regeneration (GBR)

La rigenerazione ossea guidata (GBR) è la tecnica chirurgica che permette la neoformazione di osso in sedi anatomiche con difetti o atrofie verticali, orizzontali o combinate. Essa ripristina un volume osseo idoneo al posizionamento di impianti osteointegrati.

Il concetto di rigenerazione ossea guidata trova le sue radici nella rigenerazione tessutale guidata (GTR) dei tessuti parodontali, descritta per la prima volta da Nyman e Karring nel 1980. Questi Autori si basarono sulle ricerche di rigenerazione neuronale eseguite da Murray, che già nel 1957 identificò tre fattori importanti per la nuova crescita ossea: la presenza di coagulo, la presenza di osteoblasti ed il contatto con il tessuto vivente.

Gli studi sperimentali di questi Autori (*Di Stefano DA, Cazzaniga A, 2008*), condotti su animali da laboratorio, dimostrarono che le cellule dei tessuti molli gengivali si riproducevano più rapidamente di quelle provenienti dal legamento parodontale. Elaborarono dunque una tecnica che prevedeva il posizionamento di una barriera biologica (nella fattispecie un filtro di cellulosa con pori del diametro di 22 µm) attorno al difetto parodontale, allo scopo di impedire la sua colonizzazione da parte delle cellule più rapide dei tessuti molli.

Era quindi possibile creare e mantenere uno spazio che permettesse alle più lente cellule mesenchimali, con potenziale capacità rigenerativa, di popolare il difetto e di rigenerare nuovo cemento radicolare, nuovo legamento parodontale e nuovo osso alveolare.

Nel 1988, Dahlin fu il primo a dimostrare scientificamente l'applicabilità dei principi biologici della rigenerazione guidata dei tessuti parodontali (GTR) alla guarigione ossea. Egli infatti dimostrò, anche sull'uomo, la possibilità di guidare ed incrementare la neoformazione ossea, mediante l'uso di una membrana-barriera che, ostacolando la colonizzazione e la proliferazione all'interno della ferita ossea del tessuto connettivale del lembo mucoso, permettesse la colonizzazione da parte di cellule osteoblastiche totipotenti provenienti dagli spazi midollari, con conseguente neo osteogenesi.

Quindi le basi biologiche della GBR consistono nel creare uno spazio contiguo al tessuto osseo, che possa contenere un coagulo di sangue meccanicamente

protetto e isolato in modo stabile dal tessuto gengivale. L'isolamento viene ottenuto con l'utilizzo di membrane barriera semipermeabili, capaci di impedire selettivamente la migrazione dal tessuto gengivale di cellule epiteliali e fibroblasti, in grado di interferire con il processo osteogenico. Tale ambiente risulta dunque favorevole alla formazione di un pattern di guarigione ossea, che prevede la migrazione, dagli spazi midollari del contiguo tessuto osseo, di cellule con potenziale angiogenetico ed osteogenico. Il pattern di guarigione ossea porta alla deposizione di matrice extracellulare che si trasformerà in seguito, secondo la fisiologia della guarigione ossea, in osso lamellare.

La rigenerazione nei difetti ossei e nelle atrofie richiede tempi molto lunghi durante i quali la barriera deve permanere, affinché il processo rigenerativo giunga a completamento: risultano determinanti fattori legati all'estensione ed alla morfologia del difetto, la vascolarizzazione e la qualità dell'osso circostante.

Le variabili, a cui il processo rigenerativo nella GBR è legato, sono molteplici:

- la stabilità biomeccanica del complesso di guarigione impedisce il collasso conseguente oblitterazione dello spazio rigenerativo;
- la chiusura per prima intenzione e senza tensione della ferita consente la protezione del complesso rigenerativo e previene la deiscenza precoce con sovra infezione batterica;
- la tipologia di scambio osmotico permesso dalla membrana consente l'apporto di nutrienti necessari alla rigenerazione ossea;
- il sigillo periferico tra il tessuto osseo e la barriera impedisce la migrazione di tipologie cellulari in competizione con quelle osteopromotrici;
- l'anatomia del difetto;
- la compliance del paziente;
- la capacità dell'operatore influisce grandemente sul risultato finale, essendo la GBR una delle cosiddette procedure high technique sensitive.

Le complicanze, che sembrano avere più peso nel determinare un'incompleta guarigione, sono il collasso della barriera con perdita della funzione space-

making e l'esposizione della membrana con conseguente sovra infezione batterica.

La rigenerazione ossea guidata avviene seguendo una sequenza programmata di eventi biologici, del tutto analoga all'evoluzione di un normale processo di osteogenesi, inizia quindi sempre con la neovascolarizzazione del difetto.

Nella colonizzazione di un difetto da parte di cellule, hanno rilevante importanza fattori di crescita, ormoni e la formazione di una impalcatura appropriata per proliferazione e la differenziazione delle cellule osteoprogenitrici.

Una GBR di successo segue i cosiddetti principi PASS:

1. Chiusura della ferita primaria;
2. Angiogenesi;
3. Mantenimento dello spazio;
4. Stabilità della ferita.

PASS Figure 2

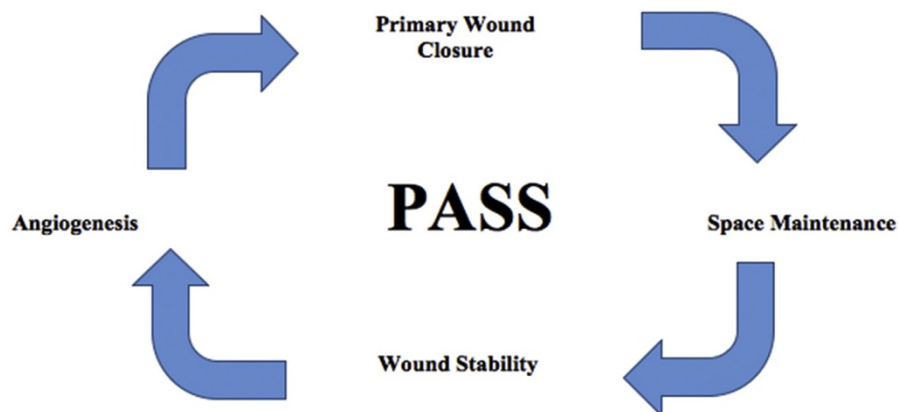


Figura.7 Diagramma dei principi alla base della GBR

Tecnica chirurgica

Viene praticata un'incisione mediana su tutta la lunghezza del difetto e le incisioni di rilascio verticali vengono fatte da 1 a 2 denti di distanza dal sito da trattare. Nel caso di un sito edentulo posteriore, un'incisione a “mazza da

hockey” verso il buccale, appena anteriore al cuscinetto retromolare, si estende di 4 mm oltre la giunzione mucogengivale. Se è presente un difetto alveolare verticale, viene praticata una piccola incisione verticale linguale 1 dente in avanti rispetto al difetto (di solito l'area premolare) da trattare, leggermente oltre la giunzione mucogengivale.

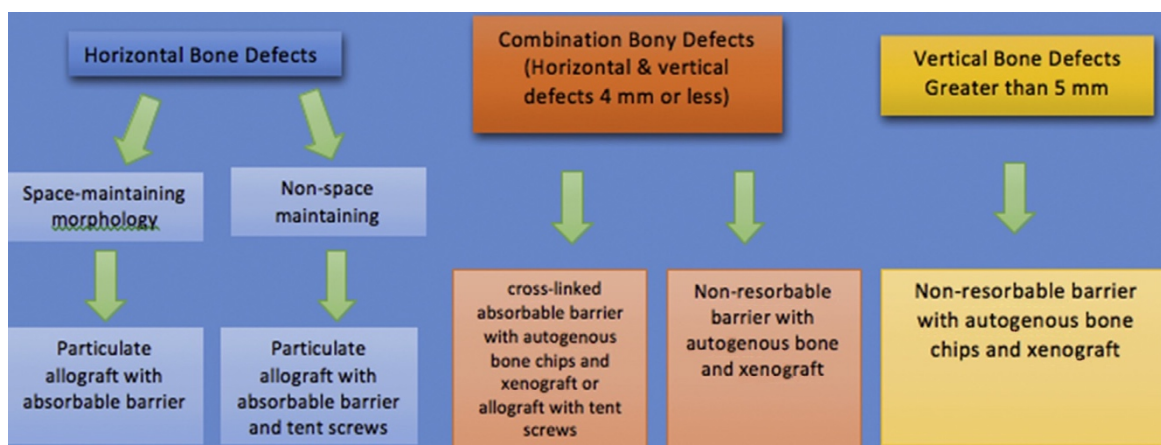


Figura.8 *Diagramma del trattamento dei difetti ossei orizzontali e verticali in GBR*

Elevazione del lembo e preparazione del sito

L'elevazione del lembo mucoperiostale a tutto spessore viene completata almeno 5 mm oltre il difetto da trattare. Viene completata l'accurata rimozione di qualsiasi residuo di tessuto molle e viene eseguita la decorticazione con una piccola fresa rotonda attraverso l'osso corticale nel midollo osseo per iniziare l'angiogenesi.

Raccolta dell'osso o utilizzo di biomateriali

Quando si trattano difetti alveolari più grandi con una componente verticale significativa, l'uso di trucioli ossei autogeni o di xenoinnesti è vitale. Il piano mandibolare del ramo buccale è il sito principale del donatore. Per eseguire questo passaggio, vengono utilizzati raschiatori ossei.

Rilascio del lembo

Il rilascio del lembo vestibolare si ottiene effettuando un'incisione con una lama 15 o 15c, appena attraverso il periostio, vicino alla base del lembo. Questa incisione collega le incisioni verticali mesiali e distali. Questa viene,

inoltre, modificata per evitare danni al nervo mentale andando in una direzione più coronale sopra il nervo. Si consiglia un'incisione più superficiale, utilizzando la strumentazione smussata per iniziare a separare le fibre elastiche nel lembo. L'elevazione del lembo linguale è limitata dalla posizione del muscolo miloioideo. Più anteriormente, può essere utilizzata la parte posteriore di una lama 15 per separare il periostio e, con strumentazione smussata, le fibre elastiche vengono ulteriormente separate. Posteriormente, si raccomanda solo la strumentazione smussata per evitare potenziali traumi del nervo linguale. I raschietti possono essere fatti avanzare nelle fibre elastiche e aperti per rilasciare ulteriormente il lembo buccale. Quanto detto sopra consentirà la chiusura senza tensione sull'innesto.

Fissazione della barriera

A questo punto viene effettuato il posizionamento di una membrana, ad oggi vengono predilette quelle riassorbibili in collagene o in osso corticale eterologo. Questo passaggio assume un'importanza fondamentale nelle tecniche di rigenerazione ossea guidata.

Chiusura del lembo

Si procede, infine con la chiusura del lembo mediante l'applicazione di suture.

5.2.3 Autogenous Onlay Block Bone Grafting

I difetti alveolari orizzontali e verticali della mandibola e della mascella hanno guidato l'uso di siti di raccolta ossea autologhi e il progresso delle tecniche di innesto nella pratica clinica della riabilitazione dentale con impianti. Per molti anni si sono effettuati prelievi a blocco dal ramo mandibolare, dal mento, dalla calvaria e dalla cresta iliaca anteriore e posteriore e, nonostante l'osso autologo abbia da tempo dimostrato di essere il gold standard, i rapidi sviluppi nella comprensione della fisiologia e della crescita ossea hanno portato a risultati quasi uguali mediante l'uso di xenoinnesti.

5.2.4 Alveolar Distraction Osteogenesis (ADO)

L'osteogenesi della distrazione alveolare (ADO) è un metodo per generare nuovo osso a seguito di un'osteotomia con graduale distrazione. Il metodo si basa sul principio di tensione-stress descritto dal dott. Ilizarov. L'ADO determina un aumento sia del tessuto osseo che dei tessuti molli. Il processo di allungamento graduale porta alla differenziazione delle cellule staminali, all'angiogenesi e alla mineralizzazione. Il metodo è stato clinicamente eseguito per la prima volta nel 1992 da McCarthy e colleghi su mandibole ipoplastiche di bambini sindromici.

La ADO può essere divisa in unidirezionale, bidirezionale e orizzontale. L'ADO unidirezionale provoca l'allungamento verticale. In caso di una grande carenza mesiodistale superiore a 3 cm, l'uso di due dispositivi di distrazione, uno su ciascun lato del difetto, consentirà il controllo sul vettore di allungamento e previene il collasso del segmento distratto. L'ADO bidirezionale viene utilizzato per il controllo verticale e sagittale concomitante sul vettore di allungamento. L'ADO orizzontale viene eseguita in presenza di carenze sagittali.

I dispositivi ADO sono inoltre suddivisi in extraossei, intraossei e distrazione da impianto. I dispositivi extra-ossei sono i dispositivi più utilizzati. La distrazione intraossea e la distrazione da parte degli impianti richiedono un abbondante osso basale per il supporto. Inoltre, rispetto ai dispositivi extraossei, sono più soggetti alle influenze negative delle forze laterali che possono influenzare il vettore di allungamento e provocare il riassorbimento osseo che circonda il dispositivo di distrazione. I dispositivi di distrazione extraossei, d'altra parte, richiedono un grande lume subperiostale, influenzando così l'afflusso di sangue periostale e con conseguente possibile deiscenza ed esposizione dei tessuti molli. Tuttavia, sono i dispositivi di distrazione più diffusi utilizzati.

L'ADO è composta da più fasi: inizia con un'osteotomia e il posizionamento del dispositivo di distrazione. Successivamente, vi è un periodo di latenza di diversi giorni in cui avviene l'organizzazione del callo. Dopo il periodo

di latenza, viene iniziata una distrazione graduale a una velocità di 0,5 mm/giorno. La fase finale consiste nel periodo di consolidamento e dura diversi mesi. In questa fase si osservano la maturazione e la mineralizzazione del callo.

Indicazioni

- Grave carenza di osso alveolare superiore a 6 mm;
- Mancanza di tessuto molle per la chiusura dopo l'aumento osseo;
- Rifiuto di un secondo sito donatore per l'innesto osseo da parte del paziente.

Controindicazioni

- L'altezza del segmento trasportato è inferiore a 6 mm;
- L'attaccamento periostale linguale / palatale al segmento di trasporto è stato compromesso, compromettendo così l'afflusso di sangue del segmento;
- Il segmento di trasporto non ha una larghezza sufficiente (bucco-linguale/bucco-palatale), pertanto, l'allungamento potrebbe provocare una frattura del segmento;
- Presenza di meno di 2 mm di osso tra osteotomia e IAN o seno/pavimento nasale.

Pertanto, ricapitolando, l'immagine a seguire (*Figura 9*) descrive l'algoritmo elaborato degli autori per l'aumento osseo alveolare. L'ADO ha un esito più stabile rispetto alla GBR e agli innesti di blocco, ma si osserva una recidiva dal 3% al 20%. Pertanto, si deve considerare una correzione eccessiva di pochi millimetri. Questa correzione eccessiva può essere ridotta facilmente al momento della rimozione del dispositivo e del posizionamento dell'impianto.

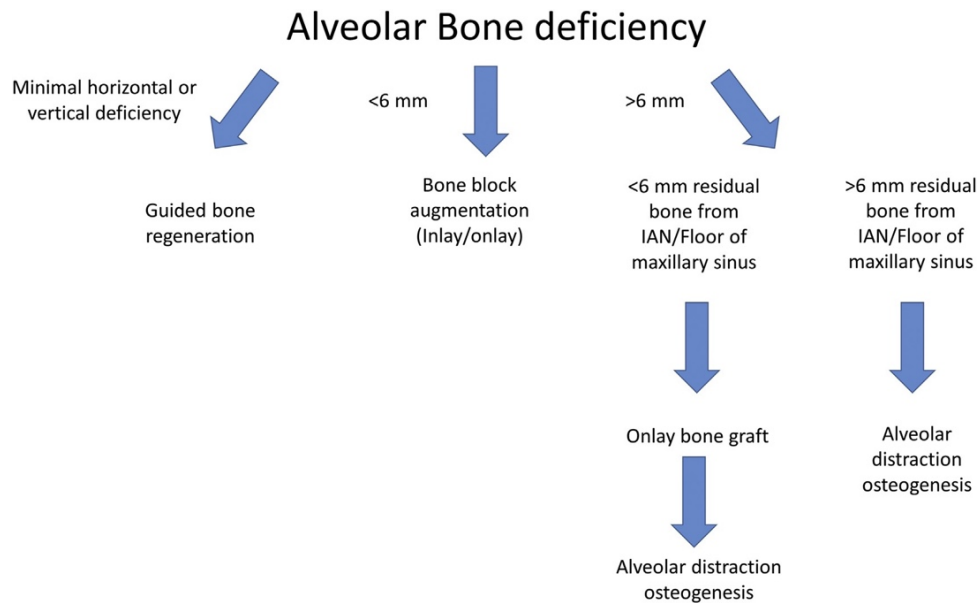


Figura.9 *Algoritmo della ricostruzione dei difetti ossei alveolari basato sulla perdita ossea verticale*

Per cui, concludendo, gli autori, *Tolstunov et al. (2019)*, nell'articolo hanno dimostrato indicazioni, alternative, benefici e rischi delle più comuni tecniche di aumento dell'osso alveolare nei difetti di cresta orizzontali e verticali. Un chirurgo esperto e competente dovrebbe basare la propria decisione sulla tecnica chirurgica più efficace ed efficiente che fornirebbe al paziente una base ossea di lunga durata per protesi implantari. Lo stato medico del paziente e la competenza di un sistema immunitario sono fondamentali nella scelta della tecnica chirurgica.

In generale, l'ultima tendenza nell'aumento dell'osso oscilla verso l'inserimento del particolato in GBR per casi di carenza di cresta alveolare da lieve a moderata. Nei più grandi difetti ossei (correlati a traumi o casi patologici), raggiungono gli obiettivi desiderati, invece, gli innesti ossei autologhi a blocco o ADO con prodotti TE, o una combinazione di tecniche in modo consecutivo. L'eccessiva correzione durante la procedura di innesto è diventata un approccio comune a causa del riassorbimento fisiologico adattativo post-chirurgico. Ciò si riferisce alle tendenze di riassorbimento intrinseche di un innesto particolare all'interno dell'ambiente funzionale. Il chirurgo dovrebbe quindi anche prestare attenzione alla logica biologica nella scelta di una particolare tecnica di aumento osseo rispetto ad un'altra.

6. MATERIALI PER LA RIGENERAZIONE OSSEA

6.1. *Biomateriali*

La possibilità di agire sulla crescita ossea è attuabile grazie ai progressi della scienza che hanno permesso sia l'applicazione di tecniche chirurgiche sempre più avanzate, sia l'utilizzo di innesti ossei e biomateriali sempre più "intelligenti" in grado di caratterizzarsi come biomimetici. Essi devono cioè essere in grado di mimare alcuni processi metabolici che fanno parte della cascata di eventi che porta alla formazione dell'osso, sostituendo e/o accelerando alcune funzioni.

L'ingegneria tissutale è definita come la scienza a carattere multidisciplinare che utilizza i principi dell'ingegneria e delle scienze biomediche per elaborare prodotti artificiali o biologici fino a creare dei derivati completamente nuovi, in grado di dar luogo alla riparazione di tessuti od organi danneggiati o addirittura alla loro rigenerazione. Essa ha permesso anche la progettazione e lo studio di biomateriali in grado di dar luogo alla formazione di nuovo tessuto osseo anche in sedi diverse dall'osso tramite un processo chiamato "osteoiduzione".

La rigenerazione ossea ha la necessità di utilizzare i biomateriali perché richiede un supporto ("scaffold") che permetta la creazione di un ambiente tridimensionale simile a quello del tessuto osseo originario, dove le cellule ed i vasi possono svilupparsi promuovendo il processo di osteoconduzione.

L'uso di biomateriali ha consentito, negli ultimi decenni, di risolvere con successo problemi di carenza e di supporto osseo in vari campi dell'odontoiatria come parodontologia, protesi, implantologia e chirurgia. Essi hanno infatti trovato applicazione per aumento o ricostruzione di creste alveolari, riempimento di difetti parodontali intraossei o dopo rimozione di cisti o tumori ossei e dopo estrazioni, elevazione del pavimento del seno mascellare e riempimento di difetti perimplantari.

La risposta che un biomateriale da innesto osseo può provocare, una volta posizionato in situ, dipende dalle proprietà biologiche del materiale stesso, ma

rimane comunque strettamente legata alle capacità di guarigione individuali dell'organismo del paziente.

“Si definisce biomateriale un materiale concepito per interfacciarsi con i sistemi biologici al fine di valutare, dare supporto o sostituire un qualsiasi tessuto, organo o funzione del corpo” (*II International Consensus Conference on Biomaterials, Chester, Inghilterra 1991*). Per ovviare l'ostacolo dovuto ad un difetto osseo, tale da non poter supportare una riabilitazione impianto-protetica, è stata introdotta la procedura dell'innesto di biomateriali.

Un materiale da innesto ideale dovrebbe:

- Essere biocompatibile, atossico, non immunogeno, radiopaco, sterile, economico e reperibile sotto varie forme;
- Possedere ottime proprietà meccaniche, in modo da supportare adeguatamente la struttura ossea circostante;
- Essere totalmente riassorbibile e sostituito da osso vitale;
- Ricalcare, una volta impiantato nel tessuto dell'ospite, nelle modalità, ma in tempi più brevi, lo stesso modello di guarigione dell'osso naturale fratturato;
- Essere bioattivo, capace cioè di determinare la rigenerazione ossea attraverso 3 meccanismi: osteogenesi, osteoinduzione, osteoconduzione. Inizialmente per la realizzazione di innesti ossei, si utilizzavano materiali biologicamente inerti per minimizzare la risposta immunitaria dell'organismo ospite. Negli ultimi decenni questo paradigma si è spostato da materiale bioinerte a bioattivo.

Osteogenesi

È la capacità di neogenesi ossea dell'innesto, indipendente dal sito donatore. Essa ha luogo quando viene promossa la formazione e la crescita di nuovo tessuto da parte di osteoblasti e loro precursori presenti nel sito di rigenerazione. Essa trae origine da cellule viventi presenti all'interno dell'innesto e con esso trapiantate in un nuovo sito. Cellule con attività osteogenica provengono dalla zona intracorticale (20%), dal periostio (30%), dall'endostio e dal midollo osseo (50%). Al contrario, le cellule della linea emopoietica, ovvero le cellule staminali che danno

origine a tutte le cellule del sangue, non sembrano avere alcuna funzione osteogenica.

Questo meccanismo si riscontra maggiormente negli innesti di spongiosa, più ricchi di cellule vitali rispetto a quelli di corticale.

Osteoinduzione

È la capacità di un biomateriale innestato di indurre la differenziazione di cellule mesenchimali indifferenziate e pluripotenti (ossia cellule che possono generare solo tessuti connettivali) provenienti dal sito ricevente o da quelli circostanti, in elementi osteogenici, determinando così la neogenesi ossea a livello sia dell'innesto che del sito ricevente, anche in sede eteropiche come il tessuto muscolare. L'osso trapiantato è in grado di indurre questa differenziazione grazie alla presenza di cellule dell'innesto sopravvissute all'insufficiente rifornimento di ossigeno (danno anossico). La differenziazione è possibile anche grazie alla liberazione, da parte dell'innesto stesso, di biomolecole quali ad esempio le cosiddette Bone Morphogenetic Proteins (BMPs), proteine che partecipano al metabolismo osseo.

Osteoconduzione

È la capacità dell'innesto di creare un supporto strutturale alla neoformazione ossea. Essa ha luogo quando un materiale da innesto forma un reticolo tridimensionale che funge da impalcatura per guidare la crescita degli osteoblasti e dei loro precursori dalle pareti del difetto (effetto *scaffold*). Si tratta di un processo di rivascularizzazione e di invasione dell'innesto da parte di cellule progenitrici provenienti dal tessuto ricevente, dapprima in periferia e poi con penetrazione all'interno dell'innesto, meglio nota come *creeping substitution*. Il materiale è progressivamente sostituito da osso neoformato che ne segue l'impalcatura inorganica.

Questi biomateriali possono essere riassorbibili o non riassorbibili. Gli innesti riassorbibili vengono degradati con un meccanismo dovuto al pH della soluzione che li circonda, o dall'azione fagocitaria di osteoclasti e macrofagi, per poi essere sostituiti da osso neoformato. Gli innesti non riassorbibili invece, occupano uno

spazio che non può essere occupato da osso e perciò vengono incapsulati nella matrice ossea.

Data l'assenza di capacità osteoinduttiva, questi sostituti ossei si differenziano dagli innesti di osso autologo per quanto riguarda il meccanismo di guarigione. I tempi di neoangiogenesi, rimaneggiamento e rimodellamento sono ritardati anche in maniera considerevole. Il quadro infiammatorio che si forma negli innesti autologhi a 7 giorni dell'intervento, nella guarigione degli innesti non autologhi prosegue fino alla seconda settimana, con una neoangiogenesi notevolmente rallentata. Il ridotto apporto vascolare riduce la migrazione di nuove cellule vitali e comincia ad instaurarsi un quadro infiammatorio cronico.

Sia che i diversi biomateriali abbiano proprietà osteoinduttive, osteoconduttive o osteogeniche è bene ricordare che il successo delle procedure in cui si utilizzano questi tipi di preparati, dipendono da diversi fattori:

- Relativi al sito ricevente: capacità proliferativa, vitalità, rivascolarizzazione e concentrazione di proteine morfogenetiche dell'osso sulla superficie del sito;
- Relativi al biomateriale: capacità di rivascolarizzazione, la struttura macroscopica e microscopica dei suoi componenti e la sua stabilità;
- Relativi al sito operato: entità del trauma chirurgico e dimensioni del difetto osseo da recuperare;
- Relativi al paziente: compliance e indice di attività metabolica dell'organismo in cui si esegue l'innesto.

6.1.1 Innesti Autologhi

L'osso autologo è il solo materiale da trapianto disponibile con proprietà osteogeniche grazie alla presenza nella porzione midollare di cellule già mature in grado di deporre nuovo osso fin dal momento dell'impianto. Per innesto d'osso autologo s'intende un innesto osseo in cui il donatore e il ricevente appartengono alla stessa specie e sono unici, l'osso è prelevato dallo stesso paziente su cui poi

viene posizionato l'innesto garantendo la completa assenza di reazioni immunitarie avverse. Inoltre, trattandosi di osso umano, è rimodellato nei tempi fisiologicamente corretti e contiene fattori di crescita ed elementi cellulari che possono sia stimolare la rigenerazione ossea nel sito di innesto, sia deporre nuovo tessuto osseo. In altri termini l'osso autologo è sia osteoconduttivo, cioè fornisce supporto meccanico ai vasi e agli elementi cellulari che andranno a colonizzare il sito di innesto, che osteoinduttivo, cioè stimola l'osteogenesi nel sito d'innesto, promuovendo la differenziazione in osteoblasti di cellule mesenchimali.

Le sue capacità di rimodellamento variano, a seconda che l'innesto sia di tessuto spongioso o corticale. L'osso corticale, data la maggior densità e la diversa struttura, garantisce un maggior supporto meccanico e un buon mantenimento del volume dell'innesto nel tempo, ma viene vascolarizzato molto più lentamente ed è soggetto ad un difficile rimodellamento. Gli innesti di tessuto osseo spongioso sono più osteogenici e osteoinduttivi grazie alla presenza di cellule progenitrici. Per la presenza di spazi intrinseci nella sua struttura, permettono una migliore diffusione di nutrienti e di cellule, mostrano un'ottima integrazione con la garanzia di ottenere una rivascolarizzazione (*Khan SN, 2015; Sen MK., 2007*).

I siti donatori possono essere extra o intraorali e spesso le sedi di prelievo extraorali sembrano richieste nei casi di aumenti di cresta ossea in edentulie totale e prolungata. I siti di prelievo intraorali sono la sinfisi mentoniera, il ramo mandibolare, zona retromolare, tuberosità del mascellare, aree edentule ma anche tori ed esostosi che possono essere presenti in volumi importanti in alcuni pazienti. Bisogna sempre tenere in considerazione le complicanze di un prelievo legati all'anatomia del sito donatore stesso, come il nervo mandibolare o il nervo mentoniero. Se poi la quantità di osso richiesta è più elevata, è necessario ricorrere ad un sito extraorale, programmando un intervento chirurgico, con un costo biologico maggiore e con il collaterale rischio di complicanze. Uno dei siti extraorali più conosciuti è la cresta iliaca posteriore, che ci permette di ottenere importanti volumi d'osso. Tuttavia, tale prelievo necessita di anestesia generale e di un doppio intervento che comporta tempi operatori e di degenza lunghi, potenziali complicazioni come dolore post operatorio, ematomi, alterazioni sensoriali per danneggiamento del nervo cutaneo laterale della coscia e limitazioni

sensoriali nella vita quotidiana, con incidenza di complicazioni post chirurgiche del sito donatore del 10% circa.

Queste motivazioni hanno spinto la ricerca ad orientarsi verso fonti d'osso alternative che presentino proprietà fisico-chimiche quanto più vicine possibile all'osso umano. Gli innesti non autologhi sono attualmente molto utilizzati, sia da soli che insieme all'osso autologo, ma possiedono solo proprietà osteoconduttive. Negli ultimi 20 anni, i **concentrati piastrinici** sono emersi nell'ambito odontoiatrico per il loro potenziale rigenerativo. Si ottengono per centrifugazione del sangue e ne esistono diverse tipologie: concentrati piastrinici ricchi di fibrina (advanced platelet-rich fibrin, A-PRF o injected platelet-rich fibrin, I-PRF), fattori di crescita concentrati (concentrated growth factors, CGF), fattori di crescita ricchi di plasma (plasma rich in growth factors, PRGF) e concentrati piastrinici ricchi di plasma (platelet-rich plasma, PRP).

Il PRP ed il PRGF appartengono ai concentrati piastrinici di prima generazione, mentre il PRF a quelli di seconda.

Il PRP si ottiene grazie ad una doppia centrifugazione del sangue. Una volta effettuato il prelievo ematico, questo viene associato ad un anticoagulante (es. EDTA) per evitare l'attivazione piastrinica e viene effettuata una prima centrifugazione. Attraverso una siringa sterile si aspira lo strato di plasma (PPP), il buffy coat (strato centrale ricco di piastrine e leucociti) e una parte di globuli rossi. Tutto ciò viene posizionato in una seconda provetta, priva di anticoagulante, e centrifugato nuovamente. Il buffy coat che si andrà a creare sarà il PRP. Per ottenere il gel piastrinico si va ad aggiungere una soluzione contenente cloruro di calcio e, a volte, trombina bovina, i quali permettono il rilascio di citochine e fattori di crescita per trasformazione del fibrinogeno in fibrina.

Il PRGF deriva dalla centrifugazione del sangue a cui viene associato un anticoagulante come il sodio citrato.

Il PRF si ottiene dopo una singola centrifugazione e non è altro che un coagulo di fibrina che si crea senza l'aggiunta di alcun additivo. Ha una polimerizzazione naturale della fibrina che avviene lentamente durante la centrifugazione, portando

così ad una trasformazione biologica del fibrinogeno in fibrina senza l'aggiunta né di calcio cloruro né di trombina bovina. Questa tecnica permette di avere una concentrazione di piastrine fino a cinque volte maggiore rispetto a quella normalmente presente nel sangue. Per la terapia rigenerativa, può essere utilizzato sia come innesto che come membrana. In qualità di innesto, è in grado di favorire la crescita di cellule periostali, le quali hanno un ruolo determinante nella riparazione ossea. Le membrane di PRF, invece, permettono la guarigione dei tessuti molli, proteggendo in sito chirurgico, ed agiscono come scaffold per promuovere la crescita di nuovi vasi sanguigni e lo sviluppo di cellule osteoprogenitrici. Tutto ciò è dovuto al fatto che, dopo una settimana dall'inserimento e fino a 28 giorni dopo, è in grado di rilasciare fattori di crescita.

Il CGF è un concentrato piastrinico avanzato di seconda generazione, ottenuto con tecnologia di centrifugazione continua differenziale, contenente molti tipi di fattori di crescita e fibrina e in grado di facilitare la guarigione dei tessuti molli e duri. Il CGF è diverso dal plasma ricco di piastrine (PRP) e dalla fibrina ricca di piastrine (PRF) nei metodi di produzione perché non vengono aggiunti additivi durante la sua produzione.

Presenta una maggiore forza adesiva, resistenza alla trazione e una maggiore viscosità rispetto alle altre preparazioni piastriniche. Il CGF ha una differenza nella velocità di centrifugazione che consente l'isolamento di una matrice fibrinica molto più grande, densa e ricca di fattori di crescita. Il CGF quindi è una matrice organica ricca di fibrina che contiene fattori di crescita, piastrine, leucociti e cellule staminali CD34 + che aiutano nel processo di rigenerazione e ha anche cellule immunologiche che sono efficaci nel regolare l'infiammazione e minimizzare il rischio di infezione. È pertanto un materiale osteoinduttivo che migliora la qualità dell'osso formato e facilita la formazione di ossa e la guarigione dei tessuti.

Dal 2010 è stato introdotto un nuovo modo di creare una matrice d'osso arricchita con fattori di crescita, meglio conosciuta come "Sticky Bone", usando la colla di fibrina autologa. Dopo la centrifugazione di una prima provetta, non in vetro, si ottengono due strati: quello superiore è costituito da fibrina autologa, mentre quello inferiore dal coagulo ematico. Il prelievo della fibrina mediante una siringa e la sua

miscelezione con un particolato osseo da vita allo “sticky bone”. Lo sticky bone, quindi è un innesto osseo solido biologico, intrappolato in una rete, e provvede alla stabilizzazione dell’innesto nel difetto, quindi accelera la guarigione dei tessuti e minimizza la perdita d’osso durante il periodo di guarigione. (*Sohn DS. et al., 2015*)
Lo sticky bone presenta numerosi vantaggi:

- È modellabile, quindi ben adattato su varie forme di difetto osseo;
- Il micro e macro movimento dell'osso innestato è impedito. Quindi il volume di aumento viene mantenuto durante il periodo di guarigione e la necessità di osso di blocco e maglia di titanio è ridotta al minimo;
- La rete di fibrina intrappola le placche e i leucociti per rilasciare fattori di crescita, accelerando così la rigenerazione ossea e i tessuti molli;
- Non sono necessari additivi biochimici per rendere l'osso appiccicoso diversamente dal PRP o dal PRGF;
- L'interconnessione della fibrina riduce al minimo la crescita dei tessuti molli nell'innesto.

6.1.2 Alloinnesti

L’osso allogenico è il tessuto osso omologo che viene prelevato da un individuo diverso ma della stessa specie. Esso presenta la stessa struttura fisica e le stesse proprietà biologiche dell’osso ricevente a garanzia di un efficace effetto osteoconduttivo. Il tessuto osseo può essere prelevato da donatore vivente (proveniente da cresta iliaca, femore, tibia, omero, coste e vertebre) o da cadavere entro 24 ore dal decesso.

Per evitare la possibilità di trasmissione di batteri, virus, prioni o cellule tumorali dal donatore all’organismo ricevente, l’osso omologo deve essere sottoposto ad un opportuno trattamento di laboratorio.

L’osso può essere congelato (FBA Frozen Bone Allograft), congelato e liofilizzato (FDBA Freeze-Dried Bone Allograft) o demineralizzato congelato e liofilizzato (DFDBA Demineralized Freeze-Dried Bone Allograft).

L’FBA conserva le proprietà osteogeniche, osteoinduttive e osteoconduttive, ma non essendo sterilizzato può costituire un pericolo di trasmissione di malattie.

L’FDBA, dopo trattamento con perossido di idrogeno, viene sottoposto a delipidizzazione con etanolo, portato a temperatura di 300°C per circa 15 ore, liofilizzato congelato in azoto liquido fino a -90°C, per poi venir sterilizzato con ossido di etilene e raggi gamma. In questo caso è l’osteoconduzione a conferire un ruolo terapeutico all’innesto, ed i rischi immunitari ed infettivi sono ridotti grazie alla distruzione delle proteine.

Nel caso del DFDBA l’osso viene sottoposto a trattamento con acido cloridrico in modo da perdere la sua componente minerale. Questo addirittura smaschera le BMP ed altri fattori precedentemente imprigionati della fase minerale amplificandone l’azione osteoinduttiva, lasciando conservate le proprietà osteoconduttive.

Tuttavia, la capacità osteoinduttiva è in funzione dell’età del cadavere (le BMP sono più presenti nei giovani), dalle dimensioni delle particelle (200-1000 micron sembrerebbero fornire risultati migliori) e della sede del prelievo (l’osso membranoso presenta una maggiore concentrazione di BMP, rispetto all’osso endocondrale).

Questi tipi di innesti sembrano usati per indurre la formazione di osso in condizioni cliniche come riempimento di difetti ossei prodotti dopo l’asportazione di cisti, per ricostruzioni cranio-maxillari (*Tiedeman JJ., 1995; Tynan JR., 2005, Docquier PL., 2005*).

Studi istologici hanno dimostrato come questo tessuto sostitutivo dell’osso sia scarsamente riassorbibile anche a distanza di tempo, poiché isole del materiale sono state rinvenute nell’osso rigenerato a distanza di anni, non potendolo porre tra i biomateriali più indicati.

6.1.3 Xenoinnesti

Gli innesti eterologhi derivano da una specie diversa da quella del ricevente, e pertanto richiedono specifici trattamenti di laboratorio che portino alla distruzione completa di proteine e di tutti i componenti che potrebbero comportare rischi di trasmissioni di batteri, virus, prioni o innescare risposte immunitarie anomale.

Possono essere di origine bovina, suina od equina. Tali innesti presentano quindi solo proprietà osteoconduttive. Rispetto all'osso autologo, l'innesto eterologo ha il vantaggio di una grande disponibilità coadiuvata da un costo relativamente ridotto, e tali aspetti lo rendono adatto al trattamento di difetti ossei di grande dimensione. Inoltre, il suo impianto necessita di un singolo intervento, evitando invalidità residue dovute a prelievo di tessuto osseo in altre zone.

Tra questi biomateriali uno dei più studiati è sicuramente il Bio-Oss di Geistlich Biomaterials. Esso è osso bovino deproteinizzato presente sul mercato in granuli o blocchi. È inoltre presente una versione che contiene 90% di granuli di Bio-Oss e 10% di collagene di origine suina (Bio-Oss Collagen). Sono stati condotti molti studi che dimostrano come l'utilizzo di tali materiali, in associazione con membrane, porti con predicibilità la formazione di nuovo osso. Lo studio di Hammerle (*Hammerle et al.2008*) riporta 12 casi di aumento orizzontale di cresta tramite utilizzo di Bio-Oss e membrana in collagene fissata con pin di acido polilattico. Dopo circa 9/10 mesi dall'intervento di aumento di volume sono stati inseriti gli impianti. In tutti i casi, tranne uno, il volume osseo post rigenerazione era adeguato per poter posizionare l'impianto. Quattro mesi dopo il loro posizionamento, tutti gli impianti erano ben integrati, come dimostrato da misurazioni cliniche e analisi a raggi x con endorali. I risultati di questo trial clinico hanno dimostrato che la combinazione di Bio-Oss e membrana in collagene può essere usata con successo per aumenti orizzontali in siti dove la mancanza di osso disponibile precludeva l'inserimento implantare.

Più recentemente Tirone e Salzano nel 2018 hanno condotto uno studio preliminare osservazionale con l'obiettivo di valutare istologicamente la qualità e la quantità di osso rigenerato dopo il trattamento di un alveolo non guarito con xenoinnesto bovino-derivato arricchito con collagene suino (Bio-Oss) senza membrane barriera. I campioni biotici sono stati presi durante il posizionamento implantare, ovvero dopo 4 mesi dall'innesto. In tutti e i 10 casi è stato possibile inserire gli impianti correttamente e nessuno è fallito dopo 6 mesi dal carico. Le analisi istologiche hanno dimostrato la formazione di nuovo osso in tutti i campioni. La percentuale di osso formato era del 29.1% (range tra 5% e 48%). Le particelle di materiale in

diretto contatto con nuovo osso formato erano visibili, e in 8 casi si poteva vedere osso lamellare maturo.

Altri xenoinnesti di origine suina od equina sono stati altrettanto studiati. Lo studio clinico randomizzato di Festa et al. ha avuto come obiettivo quello di analizzare e comparare i cambiamenti di dimensioni della cresta alveolare in seguito ad estrazione dentale usando xenoinnesto di origine suina (OsteoBiol Gen-Os) con membrana o lasciando l'alveolo non innestato. Il Gen-Oss, osso cortico-spongioso suino collagenato al 20%, è un biomateriale biocompatibile e biodisponibile, gradualmente riassorbibile e svolge azione di supporto alla neoformazione ossea contribuendo a preservare la forma e il volume originario dell'innesto. Inoltre, grazie al contenuto di collagene, il prodotto agevola la formazione del coagulo ematico e la successiva invasione delle cellule riparatrici e rigenerative, favorendo la completa "restitutio ad integrum" del deficit osseo. In tutti e i 15 pazienti presi in esame l'utilizzo di xenoinnesto suino con membrana ha permesso di ridurre il riassorbimento di tessuto osseo, cosa che invece non ha impedito l'alveolo non innestato.

Risultati simili sono stati ottenuti anche da Barone et al. nel loro studio del 2008. Tramite l'innesto di osso suino e di una membrana in collagene nell'alveolo post estrattivo si è permesso di limitare significativamente il riassorbimento di tessuto osseo. Inoltre, le biopsie effettuate dopo 7 mesi hanno mostrato nei siti innestati la presenza di osso trabecolato, molto mineralizzato e ben strutturato, mentre l'osso nei siti non innestati presentava una minor percentuale di mineralizzazione.

6.1.4 Innesti Alloplastici

Sono biomateriali sostitutivi dell'osso di origine sintetica o inorganica che posseggono capacità osteoconduttiva e capacità di mantenere legami stabili nel tempo con l'osso neoformato. Essi possono essere utilizzati da soli oppure essere abbinati all'osso autologo per la loro capacità di funzionare sia come scaffold sia come sostegno volumetrico per il tessuto da ricostruire.

Le ceramiche bioattive sono così definite perché hanno la caratteristica di stabilire un rapporto chimico con il tessuto osseo circostante.

Le ceramiche bioinerti invece, non hanno questa buona proprietà, e questo limita il loro impiego in campo chirurgico, anche se hanno un miglior comportamento meccanico rispetto alle bioattive.

I materiali di sintesi hanno anche il vantaggio di non prestare rischi di trasmissione di malattie, di essere disponibili anche in grandi quantità, di poter essere utilizzati come carriers per fattori di crescita e cellule.

I principali biomateriali alloplastici sono: biovetri, idrossiapatite, calcio fosfato, solfato di calcio e polimeri.

- Biovetri

Sono vetri biocompatibili e osteoconduttivi, che inseriti chirurgicamente nell'osso sono capaci di formare legami chimici con esso, di promuoverne la formazione e di essere ad esso integrato. I biovetri contengono la silice, un fondente, l'ossido di sodio, e uno stabilizzante, l'ossido di calcio, e in minor misura pentossido di fosforo, e si presentano sotto forma di granuli di diametro di 300 micron.

La bioattività è legata ad un processo di degradazione idrolitica superficiale del fosfosilicato vetroso. Una volta che le particelle di biovetro entrano a contatto col plasma sanguigno avviene una migrazione di ioni calcio, fosforo e silicio del vetro con conseguente sviluppo di uno strato di silice in forma di gel nell'interfaccia vetro-tessuto osseo, ad elevato contenuto di ioni ossidrili. Il gel, col tempo, cresce e si sviluppa in fosfato di calcio amorfo, trasformandosi poi in cristalli simili a quelli dell'idrossiapatite. Questo strato superficiale apatitico è riconosciuto come proprio dalle cellule osteogeniche e si instaura così un legame stabile tra vetro e osso. La porosità propria di questi materiali fornisce un'impalcatura sulla quale l'osso neoformato può essere depositato, solo dopo naturalmente la vascolarizzazione e la differenziazione degli osteoblasti che penetrano nel materiale. Gli ioni calcio e fosfato, rilasciati dal materiale, vengono riassorbiti dai fluidi dell'organismo, così da essere utilizzati nella formazione ossea.

Essi sono biomateriali scarsamente o per niente riassorbibili, in quanto gli osteoclasti non sono in grado di eliminare materiali a base di silicati. Rimangono quindi sotto forma di materia vetrosa estremamente solida, particolarmente indicati in tutti quei casi in cui sia necessaria una buona stabilità strutturale.

- Idrossiapatite

L'idrossiapatite (HA) è la componente inorganica dell'osso e ne costituisce l'impalcatura. Essa può essere ricavata da sostanze naturali (ricavata da osso bovino o scheletro di corallo) o da sostanze sintetiche (HA sintetica ottenuta da sali di fosfato di calcio).

L'HA corallina si ottiene dal corallo naturale, costituito principalmente da carbonato di calcio sotto forma di aragonite porosa, che presenta una struttura tridimensionale simile a quella dell'osso. La sua struttura porosa permette una veloce penetrazione di cellule e vasi al suo interno, grazie a pori di diametro di circa 150 micron, garantendo un'attività osteoconduttiva. È disponibile sotto forma di granuli o blocchi. L'HA corallina viene riassorbita solo in minima parte e in tempi lunghi (anni), durante i quali l'osso cresce all'interno e attorno ai granuli.

L'HA sintetica è uno dei materiali di sintesi da più lungo tempo sul mercato e maggiormente studiato. È una ceramica biocompatibile, prodotta attraverso una reazione ad alta temperatura che porta alla formazione di una struttura cristallina di fosfato di calcio. Le dimensioni dei pori che la ceramica deve presentare, dovrebbero essere simili a quelle dell'osso spongioso, per garantire la rivascolarizzazione e la colonizzazione delle cellule capaci di produrre osso. Ecco quindi che la capacità osteoconduttiva è fortemente influenzata dalla dimensione dei pori: un diametro compreso tra 80 e 200 micron permette un proporzionale aumento della superficie di contatto e di interazione con i tessuti e con i liquidi fisiologici dell'osso, mentre diametri inferiori non permettono l'invasione di cellule risultando così non osteoconduttivi né riassorbibili. Nelle varie idrossiapatiti è inoltre importante la conformazione dei cristalli, in quanto è in grado di influenzare i processi di osteointegrazione, modulando la partecipazione dei liquidi, delle cellule e delle proteine. Il fatto che sia sintetica presenta il vantaggio di poter modificare le caratteristiche microstrutturali attraverso procedimenti tecnologici per meglio rispondere alle diverse esigenze di utilizzo. In commercio è presente in forma granulare, scarsamente riassorbibile, e in forma porosa, struttura che invece ne favorisce il riassorbimento.

- Polimeri (PLA e PLG)

I prodotti a base di polimeri più utilizzati sono i copolimeri dell'acido polilattico (PLA) e poliglicolico (PLG). Si tratta di materiali sintetici altamente biocompatibili, di facile maneggevolezza, che non inducono reazioni immunologiche o infiammatorie, dotati di capacità osteoconduttive e che vengono completamente sostituiti da osso trabecolare. Il PLG degrada rapidamente (circa 2 mesi), mentre il PLA, più idrofobo, permane più a lungo (anche 12 mesi). Per queste loro caratteristiche il tempo ed il grado di riassorbimento dipendono dal loro rapporto percentuale. Il materiale è disponibile in polvere, gel o spugne, e non essendo radiopaco, permette di valutare meglio la formazione di tessuto osseo nei mesi successivi all'applicazione. I granuli e la polvere del copolimero sono maggiormente osteoconduttivi della versione gel, anche se quest'ultimo, grazie alla sua azione aggregante che lo rende più utilizzabile, viene utilizzato in associazione ad altri materiali eterologhi.

- Beta fosfato tricalcico

Il fosfato tricalcico è una ceramica sintetica costituita da calcio e fosforo in rapporto 3:2. Grazie alla sua struttura microscopica e alle interconnessioni fra i pori, è in grado di formare un valido legame chimico con l'osso ed è riassorbibile. Ne esistono due tipi con diverse proprietà biologiche: la forma alfa, e la forma beta. La prima ha tempi di riassorbimenti più lunghi che richiedono anni, mentre la seconda si riassorbe più velocemente. Essendo un materiale molto rigido ma altrettanto fragile, il suo uso è consigliato in zone non sottoposte a carico, come i difetti parodontali e le cavità cistiche. L'esame istomorfologico condotto dopo 4 settimane dall'innesto di TCP per il trattamento di difetti ossei parodontali a 1 parete mostrava una neoformazione ossea intorno ai granuli di biomateriale con una fusione dell'interfaccia tra la superficie ossea costituente la parete del difetto e la superficie del TCP innestato. Si osservava anche un aumento dell'attività osteoclastica di neoangiogenesi intorno all'innesto, che conferma le proprietà del TCP di incrementare il turnover osseo, stimolandone il rimodellamento (*Sabattini VB., 2007*). Il TCP presenta un riassorbimento progressivo, diversamente da quanto accade con l'idrossiapatite, con una liberazione di ioni calcio e fosforo che

concorrono alla neoapposizione di osso, cemento e legamento parodontale (*Stein et al., 2009*).

- Solfato di calcio

Il solfato di calcio è uno dei materiali più conosciuti, in quanto è stato utilizzato in ortopedia dal 1900. Nonostante la sua composizione sia molto simile a quella dell'idrossiapatite, il solfato di calcio si distingue da quest'ultima per il maggior contenuto in calcio, per la differente densità e solubilità, per le differenti proprietà chimico-fisiche, ma soprattutto per la capacità di essere totalmente riassorbito, senza produrre infiammazione o reazione da corpo estraneo. Esso viene prodotto tramite un processo di calcinazione a partire dal gesso naturale. Il solfato di calcio emiidrato è presente in due forme: alfa e beta. La forma beta è la più comunemente usata, formulata in granuli per ovviare il problema dell'assorbimento troppo rapido della preparazione in polvere. È biocompatibile, bioattivo e riassorbibile in dodici settimane (*Peters CL., 2006*). Esso però va incontro ad una significativa perdita delle sue proprietà meccaniche al momento della sua degradazione, quindi la sua scelta è discutibile in difetti importanti. Potrebbe invece essere usato per il riempimento di cavità cistiche (*Peters CL., 2006*).

6.2. Membrane

Le membrane agiscono come una barriera selettiva, impedendo fisicamente la crescita di tessuto fibroso, senza ostacolare l'apporto ematico.

Per assolvere al compito stabilito, le membrane devono avere una serie di requisiti strutturali così schematizzabili:

- devono essere costituite da *materiali biocompatibili*, per non innescare processi flogistici locali: ciò consentirà una guarigione dei tessuti, con l'integrazione della membrana stessa nel processo, al fine di creare un sigillo verso l'esterno;

- devono possedere caratteristiche di superficie tali da *impedire il passaggio di tessuto connettivo fibroso* al di sotto e proteggere da un'eventuale contaminazione batterica, in caso di deiscenza della ferita chirurgica;
- devono avere caratteristiche di *permeabilità selettiva*, permettendo lo scambio di nutrienti, ma impedendo il passaggio cellulare;
- devono essere in grado di poter *mantenere in modo stabile e duraturo lo spazio* sottostante lasciato, al fine di poter meglio consentire la stabilizzazione del coagulo e la conseguente formazione ossea voluta;
- devono consentire una maneggevolezza tale da permettere al clinico di plasmarla, adattandola alle situazioni anatomiche incontrate.

Le membrane si dividono in **riassorbibili** e **non riassorbibili** in base alla loro capacità di essere degradate dall'ospite, mediante i comuni processi flogistici di riassorbimento.

6.1.2 Membrane Riassorbibili

Nella rigenerazione dei difetti più ampi, le membrane riassorbibili consentono di evitare un secondo intervento per la loro rimozione, riducendo l'incidenza dell'esposizione e delle relative complicanze.

Il principale svantaggio delle membrane riassorbibili è legato alla scarsa predicibilità del tempo di riassorbimento, influenzata anche dalle caratteristiche del singolo individuo e alla tendenza al collasso, dimostrata da queste membrane.

Le membrane riassorbibili più studiate sono quelle composte di **dura madre, poliuretano, acido polilattico, acido poliglicolico, membrane di corticale ossea, pericardio e soprattutto collagene**.

Queste ultime sono state sicuramente le più sperimentate su modelli animali e umani: ai fini della GBR il materiale più utilizzato è il *collagene tipo I*, derivato dal derma o dai tendini di origine bovina, suina o equina, che presenta tempi di riassorbimento variabili dalle 4 alle 8 settimane. I vantaggi nell'utilizzo del collagene sono dovuti al suo ruolo attivo nella formazione del coagulo, all'attività chemiotattica nei confronti dei fibroblasti gengivali e del legamento parodontale ed al fatto che esso è uno dei costituenti principali del tessuto connettivo parodontale.

I principali svantaggi sono connessi con la risposta antigenica, che questo materiale induce nell'ospite e la conseguente rapida degradazione enzimatica a cui va incontro ad opera delle collagenasi di macrofagi e leucociti polimorfonucleati.

Tra i polimeri sintetici riassorbibili, *l'acido polilattico e l'acido poliglicolico* rappresentano attualmente una valida alternativa al collagene: sono privi di componenti allogenici e xenogenici e non inducono una risposta antigenica significativa.

In base allo spessore, alla struttura, alla composizione chimica offrono diversi gradi di stabilità; l'associazione con altri copolimeri, quali esteri dell'acido trimetil-carbonico (TMC), dimetil-trimetil-carbonico (DMTMC) o dell'acido citrico, migliora la maneggevolezza dell'acido polilattico, rendendolo più flessibile e soffice, e ne rallenta la velocità di riassorbimento, comunque paragonabile a quella del collagene (4-3 settimane).

La maggior parte delle membrane riassorbibili utilizzate fino ad oggi ha una cinetica di riassorbimento troppo veloce, per essere utilizzata come standard nella GBR. Infatti, la perdita di stabilità e l'interferenza dei prodotti di degradazione non assicurano, per un periodo di 6 mesi o più, un processo rigenerativo indisturbato al di sotto della barriera.

Nel tentativo di conferire tempi di riassorbimento compatibili alla GBR il collagene tipo I è stato associato a polimeri sintetici in strati sovrapposti (*membrane trylayer*), fornendo risultati promettenti nella fase sperimentale.

Sono disponibili in commercio anche membrane in collagene di seconda generazione, ottenute attraverso processi di cross-linking, nei quali il collagene tradizionale viene trattato con agenti fisici o chimici, per ottenere periodi di biodegradazione più lunghi.

Risultati di studi animali hanno dimostrato che le membrane cross-linked (collagene ad alta densità), acquisendo una maggiore resistenza alle collagenasi umane e batteriche, vengono degradate molto più lentamente rispetto alle membrane in collagene non cross linked.

Una membrana riassorbibile, che sembra coniugare un adeguato tempo di riassorbimento alla sua versatilità, è rappresentata da una lamina di 0.2 mm di *tessuto osseo corticale equino*. La sua composizione è data da un'alta densità di

collagene tipo I e apatiti ossee (45%). Essendo osso, il suo riassorbimento/rimaneggiamento avviene ad opera degli osteoclasti. Per tale motivo la si può considerare autoregolante e rappresenta una valida protezione per circa 12 mesi.

6.2.2 Membrane Non Riassorbibili

Le membrane non riassorbibili hanno come principale svantaggio quello della necessità di un secondo intervento chirurgico per la loro rimozione. La loro esposizione può comportare infezione del tessuto osseo sottostante ed interruzione del processo rigenerativo. Se l'infezione che deriva da questa evenienza non viene repentinamente dominata, si può arrivare anche alla perdita completa del tessuto osseo innestato.

Il **politetrafluoroetilene espanso (e-PTFE)** è un materiale in grado di permettere il passaggio di liquidi, ma non di elementi cellulari e non subisce nel tempo l'idrolisi dell'organismo in cui è inserito. Molti studi, sia sperimentali che clinici, ne hanno fatto i gold standard di riferimento per le altre membrane. Il e-PTFE è un materiale inerte biocompatibile, che può presentare una microstruttura variabile, a seconda dell'impiego clinico richiesto. Tale membrana è costituita da una porzione interna che impedisce il passaggio cellulare e fornisce la rigidità richiesta e da una porzione esterna, più porosa, per permettere la crescita del tessuto sovrastante. Attualmente alcune di queste membrane hanno nel loro interno delle sottili lamine in titanio, che favoriscono l'azione di mantenitore di spazio.

Tra le altre membrane non riassorbibili, troviamo **PTFE non espanso, dighe di gomma, e membrane o griglie in titanio**.

Queste ultime sono totalmente inerti e osseofiliche e hanno una efficacia quando sono utilizzate con innesti di osso autologo. Inoltre, la loro eventuale esposizione sembra non creare problemi ai processi di rigenerazione. Si osserva infatti una proliferazione dei tessuti molli e una riepitelizzazione sotto la griglia di titanio esposta.

La diga di gomma, conosciuta soprattutto come mezzo di isolamento del campo operatorio in odontoiatria conservativa ed in endodonzia, può essere composta in lattice o in materiale sintetico, come ad esempio elastomero sintetico.

Tutti gli studi fin ora effettuati confermano il grande potenziale di questo materiale nella GBR e GTR, come membrana non riassorbibile. D'altronde la sua biocompatibilità è dimostrata dall'uso che ne è stato fatto, come materiale per il drenaggio trans mucoso in Chirurgia Orale e Maxillofacciale, mentre le sue capacità rigenerative sono state provate dalla ricostruzione congiuntivale nei conigli, impianti alveolari nei topi e dalla guarigione di ulcere cutanee. Inoltre, uno studio di Ereno et al (2010) dimostra anche l'assenza di allergia o rigetto ed effetti collaterali noti legati a questo tipo di materiale.

Tra i suoi ulteriori vantaggi vediamo l'impermeabilità, ottenuta dalla sua natura non porosa che impedisce l'accumulo di placca e il passaggio dei batteri, che invece si verifica con l'e-PTFE.

Questa superficie liscia può però presentare anche degli svantaggi, come la minore integrazione del tessuto connettivo alla membrana, che potrebbe condurre ad una maggiore migrazione epiteliale, al di sotto del versante interno del lembo muco gengivale ed alla precoce esposizione della membrana. Sebbene la diga di gomma non sia in grado di mantenere una forma, rendendo necessario l'utilizzo di materiali da riempimento, la sua tensione elastica garantisce un supporto per il lembo gengivale ed un sigillo intorno al dente.

7. FIBRINA SIGILLANTE

I sigillanti a base di fibrina sono dei materiali non citotossici, completamente riassorbibili e matrici biologiche che simulano le ultime fasi della cascata naturale della coagulazione, formando una struttura di fibrina simile a quella di un coagulo fisiologico. Questi materiali sono costituiti da due componenti: una di fibrinogeno e una di trombina.

La parte di fibrinogeno contiene una soluzione altamente concentrata di fibrinogeno umano che, se mescolato con la trombina, viene convertito in monomeri di fibrina. La lisi prematura del coagulo è prevenuta dalla aprotinina, un inibitore fibrinolitico (*Matras, 1985; Alving et al., 1995*) che impedisce il dissolvimento del coagulo naturale nell'arco delle 72h, prolungando la stabilità del coagulo fino ad una settimana.

È stato dimostrato che il fibrinogeno prima di essere convertito mediante l'azione della trombina in coagulo fibrinico ha un'azione **induttiva**: induce l'angiogenesi e la differenziazione di cellule mesenchimali in osteoblasti e fibroblasti. Inoltre, stimola la formazione della matrice extracellulare grazie alla sua grande affinità con i fattori di crescita vascolare e fibroblastico ed altre citochine. Quindi stimola direttamente sia la formazione del tessuto duro che di quello molle.

Inoltre, rinforza e stabilizza il coagulo naturale per favorire una più rapida guarigione dei tessuti molli.

È il fibrinogeno la vera **proteina adesiva**, la trombina non è altro che un attivatore, un acceleratore, e non ha alcun tipo di azione a livello molecolare sui fattori di crescita. È un reagente che favorisce la formazione del coagulo.

La colla di fibrina determina inoltre una pellicola protettiva impermeabile che protegge tutta la chirurgia fatta.

La componente di trombina, invece, contiene trombina umana altamente concentrata e soluzione di cloruro di calcio. Gli ioni di calcio sono richiesti come cofattori per la conversione enzimatica di fibrinogeno in fibrina. Il coagulo si ottiene quando la trombina reagisce sui peptidi del fibrinogeno, portando all'alterazione nella conformazione della molecola e quindi alla formazione del

coagulo di fibrina instabile e semirigido. La trombina è attivata dalla sua forma inattiva dal fattore Xa, in presenza del fattore V. La conformazione della molecola del fibrinogeno viene alterata, portando alla formazione di monomeri di fibrina. I monomeri di fibrina polimerizzano, grazie alla formazione di legami idrogeno e reazioni elettrostatiche, in fibre di fibrina instabili e solubili che si allungano e aumentano di diametro.

La trombina, inoltre, attiva anche il fattore XIII in presenza di ioni di calcio. Il fattore XIIIa converte i legami instabili presenti nelle fibre di fibrina in legami covalenti, lasciando alla formazione di un coagulo stabile e insolubile (*Radosevich et al., 1997; Dunn and Goa, 1999*). Il coagulo fibrinico, quindi, è molto importante perché rinforza il legame instabile del fibrinogeno.

Il fibrinogeno contiene dei siti di legame che normalmente si legano con i fibroblasti e le cellule endoteliali. Più specificamente, esso si lega facilmente con le integrine delle cellule bersaglio poiché è un dimero, una molecola molto semplice, ed è stato dimostrato, in vitro, che il massimo rapporto di legame tra il fattore di crescita vascolare e il fibrinogeno è di 3.8:1 e che quello dei monomeri è di 3.6:1. Invece, una volta formato il coagulo fibrinico, il fibrinogeno non è grado di stabilire questo legame perché diviene una molecola molto complessa, infatti, sempre in vitro, è stato dimostrato che il massimo rapporto di legame tra il fattore di crescita vascolare e il polimero fibrinico è 0.1:1.

Quindi la fibrina sigillante va ad imitare e a rinforzare lo stadio finale della cascata coagulativa: è un coagulo supplementare che andiamo ad aggiungere al coagulo naturale del paziente.

La tecnica che prevede l'utilizzo della fibrina sigillante è supportata sia in rigenerazione tissutale che in rigenerazione ossea da moltissima evidenza scientifica ma è ancora scarsamente conosciuta nella pratica clinica quotidiana.

Questo materiale presenta molteplici azioni:

- Induttiva
- Emostatica

- Sigillante
- Isolante
- Impermeabilizzante

Tra le sue azioni esclusive, che non hanno tutti gli altri biomateriali autologhi, perciò evidenziamo:

- Fissazione di innesti connettivali;
- Sigillo esterno delle ferite chirurgiche e rinforzo delle suture date;
- Fissazione stabile di membrane in collagene o di lamine ossee corticali senza bisogno di suturare o di fissarle con pin in titanio.

La fibrina sigillante ha una buona tollerabilità e sono stati segnalati solo pochi casi di eventi avversi (*Alving et al., 1995; Dunn and Goa, 1999*).

Essa è stata ampiamente usata in chirurgia ossea a causa delle sue proprietà adesive ed emostatiche, ma il suo ruolo nella guarigione o nella risposta del tessuto osseo è ancora controverso come possiamo evincere, ad esempio, da alcuni studi sotto riportati.

Albrektsson et al. (1982), per esempio, hanno riferito che essa ha un effetto negativo sulla guarigione dell'osso. Nel loro studio sui conigli hanno dimostrato che nei pazienti in cui è stata fatta rigenerazione con la fibrina sigillante c'era una minore formazione di osso a 5 settimane rispetto a quelli in cui sono stati messi solo gli impianti, senza previa rigenerazione. In questo studio, inoltre, è stato visto che la fibrina sigillante non migliorava precocemente guarigione rispetto ad altri convenzionali materiali autologhi.

In un altro studio, condotto da *Bösch et al.* (1977), invece, la fibrina sigillante ha avuto un effetto positivo sulla guarigione ossea ed è stato evidenziato, in seguito ad una analisi radiologica e scintigrafica, come abbia portato ad una precedente formazione ossea rispetto al gruppo di controllo.

Diversi studi, infatti, hanno recentemente evidenziato l'associazione della fibrina sigillante con le cellule ossee per il riempimento dei difetti ossei. *Perka et al.* (2000) in studio sui conigli hanno dimostrato un effetto positivo sulla formazione dell'osso nei difetti trattati con cellule periostali e fibrina sigillante. In un altro studio fatto sui topi, l'associazione di fibrina sigillante con le cellule periostali ha portato alla formazione di osso appena formato dopo 12 settimane di impianto (*Isogai et al.*, 2000).

Tuttavia, le proprietà osteoinduttive della fibrina sigillante non sono state ancora completamente dimostrate e sono ancora oggetto di controversie. *Isogai et al.* (2000) non hanno osservato la formazione di osso in siti eterotopici del gruppo controllo, composto soltanto da fibrina sigillante, mentre *Abiraman et al.* (2002), in uno studio sui topi, hanno dimostrato le proprietà osteoinduttive di questo materiale utilizzando in combinazione l'idrossiapatite e granuli di vetro bioattivi rivestiti con sigillante di fibrina. Questi compositi di fibrina ceramica impiantati per via intramuscolare nei topi producevano neoformazione ossea a 28 giorni. Risultati simili sono stati ottenuti da *Yamada et al.* (2003) con l'associazione di β -TCP, fibrina sigillante e cellule mesenchimali a 8 settimane in siti eterotopici nei ratti.

7.1. *La fibrina sigillante e i biomateriali*

È stato dimostrato al microscopio elettronico come la maglia tridimensionale della fibrina sigillante si compenetri nella struttura macro e micro-porosa della ceramica del β -tricalcio fosfato. Questo ci fa pensare come le proprietà di entrambi i materiali possano, in questo modo, sommarsi.

Le proprietà fisiche di questo composito infatti sono migliorate riscontrando una maggiore resistenza meccanica rispetto alla sola ceramica (*Wittkamp*, 1989; *Marini et al.*, 1994). Inoltre, la stabilità iniziale di questo riempitivo osseo può essere raggiunta attraverso la sua maggiore adesione alle pareti del difetto osseo.

Anche le proprietà biologiche potrebbero essere migliorate, grazie al ruolo positivo svolto dalla fibrina sulla vascolarizzazione e la neoangiogenesi nei difetti ossei. La

fibrina potrebbe promuovere lo sviluppo dei vasi sanguigni e la formazione di un tessuto di granulazione altamente vascolarizzato (*Nakamura et al., 1998*).

La fibrina sigillante non è altro che uno scaffold naturale per l'attacco e la crescita delle cellule (*Koolwijk et al., 1996; Takei et al., 1995*) e la presenza di diversi fattori di crescita in essa può avere un effetto positivo durante le fasi iniziali della colonizzazione dell'osso (*Schmoekel et al., 2004*). Nonostante questi elementi, i risultati degli studi eseguiti con fibrina e i biomateriali sono ancora oggetto di discussione.

Effetti non significativamente positivi della fibrina sigillante sulle proprietà osteogeniche

Alcuni studi sperimentali condotti su animali, in vari siti di impianto (colonna vertebrale, corpi vertebrali, cavità orale), che hanno utilizzato la fibrina sigillante e biomateriali ceramici hanno dimostrato un'assenza di effetto o dei risultati negativi. (Figura.10)

L. Le Guéhennec *et al.*

Bioceramics and fibrin sealant

BIOMATERIAL	FIBRIN SEALANT	SITE	DURATION	CAUSES	AUTHORS
allograft	Tisseel Immuno (Canada)	Spine (dogs)	6 months	Immunologic reactions between human, canine and bovine proteins	Jarzem <i>et al</i> , 1996
coral granules	Autocolle® (Platelet Rich Plasma treated using the cryoprecipitate technique)	Vertebral bodies (sheep)	2 and 4 months	Difficulty for the osteogenic cells to infiltrate the composite Triggering of chemotaxis or inflammatory cells	Cunin <i>et al</i> , 2000
Bio-Oss®	Tisseel Immuno AG Austria	Alveolar bone (dogs)	10 months	Impairment of the early vascularization of the composite because of the fibrin sealant	Carmagnola <i>et al</i> , 2000
Bio-Oss®	Tisseel Immuno AG Vienna, Austria	Alveolar bone (dogs)	1 and 3 months	Impairment of the early vascularization of the composite because of the fibrin sealant	Carmagnola <i>et al</i> , 2002

Table 1: Results from studies showing a negative effect for biomaterial-fibrin sealant composites

Figura.10 *Tabella dei risultati degli studi che mostrano gli effetti negativi sul composto fibrina sigillante- biomateriali*

Tutti questi studi, che dimostrano come la combinazione di fibrina sigillante e i biomateriali ceramici abbia effetti negativi, possono essere spiegati dal fatto che sono stati condotti in specie animali usando sigillanti fibrinici di origine umana. Le possibili reazioni immunologiche tra le componenti di diversa origine possono mettere a repentaglio la colonizzazione delle cellule ossee nel difetto osseo. Inoltre, la maggior parte di questi studi sono stati condotti su un piccolo numero di animali e non erano sempre statisticamente significativi.

Proprietà osteogeniche della fibrina sigillante

L. Le Guéhennec *et al.*

Bioceramics and fibrin sealant

BIOMATERIAL	FIBRIN SEALANT	SITE	DURATION	RESULTS	AUTHORS
Biphasic calcium phosphates	Tisseel Immuno AG Vienna Austria	Mastoid cavity obliteration (human)	2 and 3 months	Bone neoformation	Daculsi <i>et al.</i> , 1992; Bagot d'Arc and Daculsi, 2003; Le Guéhennec <i>et al.</i> , 2004; Jegoux <i>et al.</i> , 2004
Hydroxyapatite granules	Tissucol Immuno AG Austria	Craniofacial defects	8 years	Distinct ossification	Fortunato <i>et al.</i> , 1997
Hydroxyapatite granules	Tissucol Immuno AG Austria	Human maxillofacial bone defects	2.5 to 8 years	Prominent ossification	Bonucci <i>et al.</i> , 1997
Coral granules and TGFβ1	Biocol® CRTS Biotransfusion France	Cranioplasty (rabbit)	2 months	Increase in the rate of mineralization	Arnaud, 2000
Hydroxyapatite granules	Autologous plasma cryoprecipitate and thrombin	Alveolar bone (human)	Several years	Bone reconstruction	Wittkamp, 1989
Bovine porous bone mineral	Autologous Fibrinogen Fibronectin system Preparation	Periodontal intrabony defects (human)	6 months	Clinical gain in comparison with control group	Lekovic <i>et al.</i> , 2001
Bovine porous bone mineral	Tissucol Immuno AG Austria	Periodontal defect (human)	12 months	Complete filling of the defect with presence of bone-like hard tissue	Re <i>et al.</i> , 2002
Bovine hydroxyapatite	Tisseel Duo Quick Immuno Vienna Austria	Sinus floor augmentation (human)	6 months	Woven bone bridging bone trabeculae and ceramic particles	Hallman <i>et al.</i> , 2001
Bovine hydroxyapatite	Tisseel Duo Quick Immuno Vienna Austria	Sinus floor augmentation (human)	3 years	Newly-formed bone in contact with ceramic particles	Hallman <i>et al.</i> , 2001
Coral granules	Autocolle CRTS Tours France and Tissucol Immuno AG Austria	Bone defects (rabbits)	1 and 6 months	Acceleration in early bone formation with fibrin sealant	Kania <i>et al.</i> , 1998

Table 2: Results from studies showing a positive impact with biomaterial-fibrin sealant composites

Figura.11 *Tabella dei Risultati degli studi che mostrano effetti positivi sul composto fibrina sigillante - biomateriali*

Questa tabella (*Figura 11*) riassume gli studi che hanno mostrato effetti positivi dalla combinazione di fibrina sigillante e biomateriali ceramici. A differenza degli studi precedenti, negativi, la maggior parte di questi studi riporta risultati clinici osservati in vari siti ossei sugli esseri umani, e solo alcuni studi sono stati eseguiti anche su piccoli animali. Essi sono stati classificati in termini dei loro siti di impianto.

Nello specifico:

- *Daculsi et al. (1992)* ha impiantato macroporosi granuli di fosfato di calcio bifasico mescolati con sigillante fibrinico nella cavità mastoidea sia negli studi sperimentali che in quelli clinici. I risultati clinici e istologici hanno rivelato bioattività e osteoconduzione di questi materiali compositi. La neoformazione ossea era consistente con osso normale a 2 o 3 mesi dopo l'impianto (Bagot d'Arc e Daculsi, 2003).
- *Fortunato et al. (1997)* e *Bonucci et al. (1997)* hanno riportato risultati a lungo termine fino a 8 anni dopo l'intervento. I risultati clinici e istologici hanno mostrato l'integrazione della ceramica nel tessuto osseo. I granuli bioceramici sono stati incorporati nella matrice ossea calcificata senza reazioni negative come l'infiammazione o riassorbimento osseo. L'osso neoformato è stato sottoposto a processo di rimodellamento simile a quello dell'osso normale.
- Nella cranioplastica (*Arnaud, 2000.*), la tripla miscela di TGF- β 1, fibrina sigillante e corallo naturale ha dimostrato effetti positivi in uno studio sperimentale sui conigli, così come in un limitato studio clinico. Dopo 3 mesi, l'analisi radiografia post-operatoria ha mostrato fermezza clinica e una nuova formazione di opacità. È stata osservata, inoltre, la coesione tra il biomateriale composito e le strutture ossee adiacenti mediante tomografia computerizzata a 2 anni dopo l'impianto.
- In chirurgia orale è stata usata la fibrina sigillante in combinazione con granuli di idrossiapatite per ottenere la rigenerazione di creste atrofiche (*Wittkamp, 1989*). Un tunnel subperiostale ha reso possibile l'inserimento

di questo composito nella parte superiore della cresta alveolare al fine di ricostruirla. Nonostante il fatto che non sia stato condotto nessuno studio istologico, questo rapporto clinico ha dimostrato che l'utilizzo del composito fibrina-biomateriale ceramico ha avuto un impatto positivo sulla rigenerazione di creste atrofiche.

- *Lekovic et al. (2001)* ha usato la fibrina sigillante associata ad osso bovino spongioso nel trattamento dei difetti intraossei parodontali nell'uomo. Questo studio clinico, eseguito su 23 difetti, ha rivelato miglioramenti statisticamente significativi nella risoluzione della profondità di sondaggio, guadagni in attacco clinico e riempimento dei difetti rispetto al gruppo di controllo (osso bovino spongioso in combinazione con derivato della matrice dello smalto).
- Un altro effetto positivo di questa associazione è stato osservato clinicamente nello studio di *Re et al. (2002)* sui difetti infraossei parodontali. In questo studio è stato osservato 12 mesi dopo l'intervento chirurgico, un tessuto duro simile a quello dell'osso.
- La fibrina sigillante è stata anche usata in combinazione con l'idrossiapatite di derivazione ossea bovina per eseguire un aumento del pavimento del seno mascellare (*Hallman et al., 2001*). Già 6 mesi dopo l'intervento chirurgico, era possibile osservare tessuto osseo nelle biopsie istologiche.

Nello studio di *Hallman et al., 2001*, sono stati inseriti degli impianti dentali in titanio nel pavimento del seno precedentemente rigenerato con il composto fibrino-biomateriale. Dopo 3 anni, la maggior parte dell'osso appena formato era in diretto contatto con le particelle di ceramica. Metà della superficie dell'impianto dentale era occupato da osso lamellare e solo da una limitata quantità di osso immaturo.

- *Kania et al. (1998)* hanno dimostrato l'importante ruolo svolto dalla fibrina sigillante nella guarigione dei difetti ossei. In uno studio sui conigli, i difetti ossei del femore sono stati riempiti in tre differenti modi: con granuli di corallo da soli, con una miscela di sigillante di fibrina e granuli di corallo, o sono stati lasciati vuoti. A 1 mese, osteogenesi è aumentata del 46% nel secondo gruppo, rispetto al primo. A 6 mesi dopo l'intervento, le cavità

riempite con il composito mostravano osso maturo simile a quello dell'osso adulto negli animali non operati. La stessa quantità di osso è stata misurata nel gruppo trattato con solo granuli di corallo. Questo studio ha dimostrato che la fibrina sigillante ha potenziato la formazione ossea nelle fasi iniziali dopo l'impianto.

Assume un'importanza rilevante, poi, lo studio di *Le Guéhennec* che è stato condotto in vivo sui conigli e in cui è stata valutata la rigenerazione con la fibrina sigillante in relazione ai biomateriali. I risultati indicano che in presenza di sigillante fibrinico l'osso neoformato si sviluppa a una piccola distanza dalla superficie ceramica di calcio fosfato. Sono stati identificati due diversi processi di apposizione ossea. Senza la componente fibrinica (Gruppo MBCP), l'osso è in diretto contatto sulla superficie dei granuli. Questo fenomeno è comunemente descritto come *osteoconduzione* nei biomateriali di fosfato di calcio. Al contrario, la presenza della componente del fibrinogeno sembra modificare questo fenomeno standard dell'osteoconduzione: l'osso appena formato si sviluppa essenzialmente ad una certa distanza dalla superficie dei granuli, su una rete fibrillare, e questo potrebbe essere considerato un fenomeno induttivo per la differenziazione cellulare osteogenica delle cellule mesenchimali. Inoltre, un altro studio, condotto da *Jegoux et al. (2004)*, ha rivelato come l'influenza di diversi agenti antifibrinolitici non cambia le proprietà osteogeniche di tale combinazione di fosfato di calcio bifasico micro-macroporoso e fibrina sigillante.

Gli effetti positivi della combinazione della fibrina sigillante con i biomateriali ceramici, pertanto, sono stati essenzialmente osservati negli studi clinici e contrariamente agli studi sperimentali sugli animali, nessuna reazione immunologica è stata riportata negli umani.

Il composito fibrina sigillante-biomateriale ha un impatto positivo sulla manipolazione e l'adesione alle pareti dei difetti ossei. Queste proprietà fisiche e biologiche sono ovviamente un aspetto favorevole per i chirurghi. Purtroppo però, ci sono un numero limitato di biopsie eseguite per investigare l'osteointegrazione del composito in indicazioni cliniche.

Un altro studio importante, a dimostrazione che è il fibrinogeno la vera proteina ad azione osteoinduttiva è quello condotto da Le Nihouannen.

Le Nihouannen nel suo studio ha investigato sulle proprietà meccaniche e osteogeniche del materiale composito costituito da granuli di calcio bifasico (MBCP), costituiti a loro volta da 60% di idrossiapatite e da 40% di β -tricalcio fosfato, in associazione con la fibrina sigillante in due modalità differenti: la prima in associazione simultanea e la seconda sequenziale delle due componenti. L'assorbimento della trombina nei granuli di MBCO determina una modificazione delle proprietà del materiale composito. Quest'ultimo è stato successivamente impiantato nei muscoli paravertebrali delle pecore e nei difetti del condilo femorale dei conigli e a 3, 6, 12 e 24 settimane dopo l'impianto i campioni sono stati analizzati usando test istologici, l'istomorfometrici e meccanici e sono state comparate le loro proprietà.

L'analisi istologica, eseguita al SEM, di un campione impiantato nel muscolo delle pecore ha mostrato come si siano formate fibre di collagene ben organizzate con abbondanti osteociti e sistemi osteonali tra i granuli di MBCP. L'osso ectopico appariva in diretto contatto tra le particelle di calcio fosfato e circondato da tessuto muscolare.

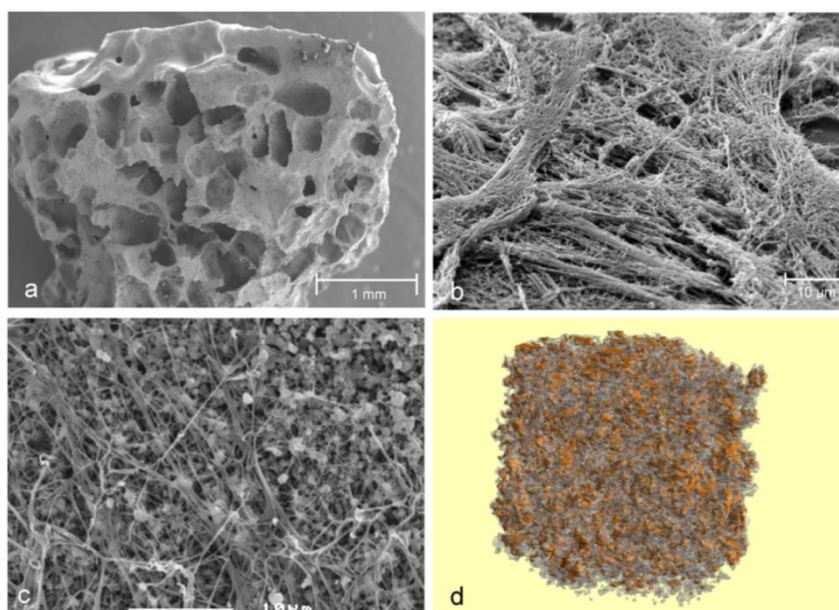


Figura.12 *Micrografie al SEM dei granuli MBCP (a) che mostrano una superficie macro e macro porosa e il coagulo di fibrina formato da solo (b) o sui granuli MBCP (c). Notare come le fibre di fibrina penetrano nella superficie microporosa.*

Immagine della visione globale in tomografia computerizzata (d) dell'impianto intramuscolare nei muscoli della schiena degli ovini del composto MBCP / fibrina a 24 settimane. (Arancione: granuli MBCP; grigio: osso; giallo: tessuto muscolare)

L'analisi istologica dei campioni impiantati nei conigli, invece, ha mostrato, in entrambi i gruppi, sia quello con un mix diretto che quello con un mix sequenziale, tessuto mineralizzato cresciuto in senso centripeto tra i granuli ceramici. Pertanto, queste analisi eseguite al SEM, hanno dimostrato le proprietà osteoconduttive di questi due materiali compositi, preparati in entrambi i modi. Al crescere del tempo di impianto, la quantità di tessuto mineralizzato sembrava crescere progressivamente: dopo 3 settimane i granuli ceramici di calcio fosfato erano distribuiti omogeneamente sul difetto osseo. Dopo 24 settimane, sono state effettuate analisi istomorfometriche degli impianti di MBCP/fibrina usando due

metodi, SEM e μ CT e si è riscontrato che la quantità di osso, indipendentemente dal metodo usato, aumentava al crescere del tempo di impianto: dopo una crescita iniziale, è stato evidenziato un plateau a 6-12 settimane e poi una successiva crescita d'osso a 24 settimane. Per entrambi i gruppi, il valore di crescita ossea stimato era tra $1.5/2.1 \mu\text{m}/\text{al giorno}$. L'osso trabecolare presentava una durezza tra $180.7 \pm 64.1 \text{ N}/\text{mm}^2$ e un modulo di Young di $7.4 \pm 2.2 \text{ GPa}$.

La formazione di osso ectopico è stata osservata in diretto contatto con i granuli, tra le microporosità e le particelle formanti le trabecole. L'osso neoformato appariva ben mineralizzato, ricco di osteociti e di strutture Haversiane. La quantità di osso ectopico si aggirava intorno ai 6.7% con il metodo BSEM e al 17% con la μ CT.

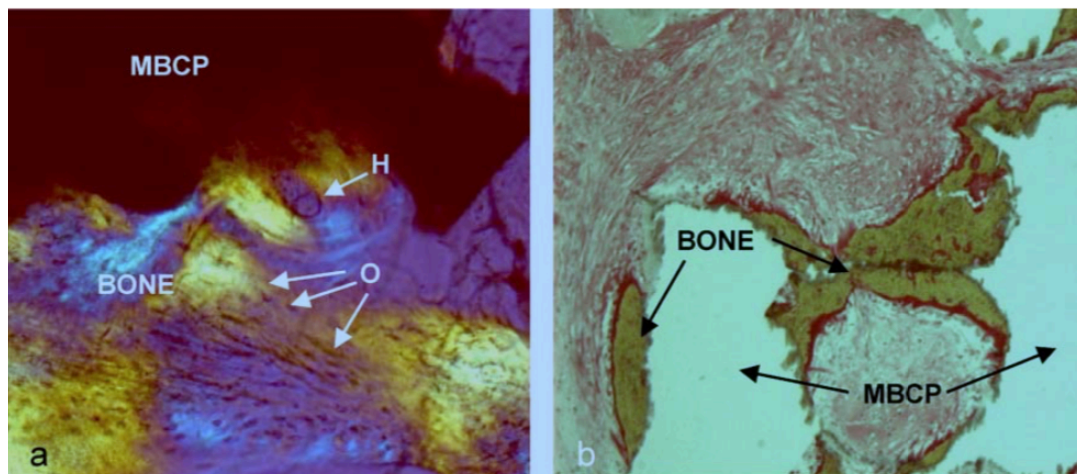


Figura.13 Immagini istologiche di granuli MBCP con colla di fibrina dopo l'impianto intramuscolare a 24 settimane nei muscoli della schiena degli ovini.

(a)

Immagini di luce polarizzata che mostrano osso mineralizzato con osteociti (O) e Strutture Haversiane (H) formate tra i granuli MBCP. (b) Immagini istologiche che mostrano una trabecola ossea tra i granuli di MBCP (macchia pentacrotica di Movat)

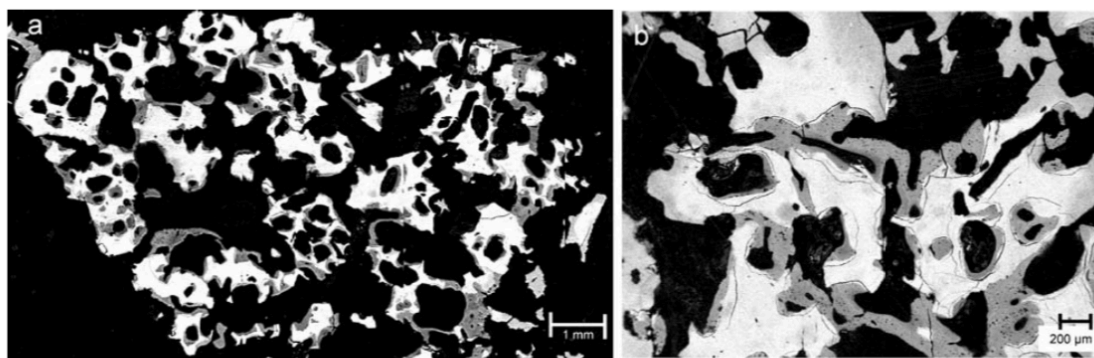


Figura.14 Immagini BSE di granuli di MBCP dopo l'impianto intramuscolare a 24 settimane nei muscoli della schiena delle pecore. Notare le trabecole ossee ectopiche formate tra i granuli MBCP e all'interno dei macropori (a) e la formazione di osso ben mineralizzato con osteociti (b).
(Bianco: granuli MBCP; grigio: osso; nero: tessuto muscolare).

La fibrina sigillante, insieme al biomateriale ceramico provoca una risposta infiammatoria locale che promuove la proliferazione e la differenziazione delle cellule mesenchimali e la formazione di tessuto osseo.

Anche la vascolarizzazione è considerata uno step cruciale nell'osteogenesi: i vasi sanguigni sono stati osservati sia macroscopicamente che istologicamente tra i granuli di MBCP e vicino al tessuto osseo mineralizzato. Le componenti della fibrina sigillante (fibrinogeno, fibronectina e trombina) possono agire solo nelle prime fasi della formazione dell'osso ectopico. La colla di fibrina inoltre, forma un coagulo simile a quello osservato nelle fratture ossee, e la degradazione di quest'ultimo generalmente avviene in pochi giorni. Il prodotto di questa degradazione e le cellule macrofagiche coinvolte in questo pathway determinano il reclutamento di molte popolazioni cellulari, tra cui le cellule osteoprogenitrici.

Il processo di neovascolarizzazione è coinvolto nei difetti ossei quando gli osteoblasti producono un'abbondante matrice extracellulare che mineralizzerà in un secondo momento. Da questo studio si è riscontrato che l'associazione tra la fibrina sigillante e il biomateriale ceramico è performante sia nell'applicazione diretta che sequenziale delle componenti della fibrina. Queste due associazioni

miravano a mostrare l'influenza sull'assorbimento della trombina nei granuli di MBCO e sulle proprietà meccaniche e osteogeniche del materiale composito.

In entrambi i materiali, dopo una iniziale crescita ossea, la quantità di osso neoformato raggiunge un plateau, corrispondente al periodo di rimodellamento dell'osso che avviene tra la 3° e la 12° settimana, e poi torna ad aumentare. Sono state riscontrate lievi differenze in questa fase di rimodellamento osseo: nel primo gruppo (MBCP/fibrina sigillante mescolati sequenzialmente) questo processo avveniva dopo circa 6 settimane dall'impianto, mentre nel secondo (MBCP/fibrina sigillante mescolati simultaneamente) avveniva più tardi, tra la 6° e la 12° settimana. Questo ritardo può essere spiegato dalle differenti proprietà osteogeniche dei diversi materiali compositi ma anche dalle differenze meccaniche confrontate dopo le sei settimane di impianto, infatti il secondo gruppo mostrava delle caratteristiche meccaniche superiori rispetto al primo. Questa differenza può essere spiegata anche dal diverso metodo di preparazione usato nella miscelazione tra i due gruppi: nel secondo, in cui le tre principali componenti del materiale composito (fibrinogeno, trombina e granuli di MBCP) vengono miscelate contemporaneamente, si determina un network tridimensionale di fibre in cui i granuli vengono incorporati mentre nel primo gruppo la trombina viene prima assorbita dalla superficie dei granuli del biomateriale e poi miscelata con il fibrinogeno. Pertanto, la miscelazione sequenziale delle componenti di fibrina determina un precoce rimodellamento osseo ma presenta delle minori proprietà meccaniche per i difetti ossei.

La fibrina, quindi, è un'impalcatura naturale che si forma a seguito di una lesione tissutale che avvia l'emostasi e fornisce la matrice iniziale utile per l'adesione, la migrazione, la proliferazione e la differenziazione delle cellule. Per tutti questi motivi essa ha catturato l'interesse degli ingegneri del tessuto osseo grazie alla sua eccellente biocompatibilità, biodegradabilità controllabile e capacità di fornire cellule e biomolecole. La fibrina è particolarmente attraente perché i suoi precursori, il fibrinogeno e la trombina, che possono essere derivati dal sangue del paziente, consentono la fabbricazione di scaffold completamente autologhi. Nell'articolo di *Noori A, Ashrafi SJ, Vaez-Ghaemi R, Hatamian-Zaremi*

A, Webster TJ. sull'ingegneria tissutale sono state messe in evidenza le proprietà uniche della fibrina come materiale per ponteggi per il trattamento dei difetti ossei. Inoltre, è stato messo in evidenza il suo ruolo nell'ingegnerizzazione dei nanocompositi del tessuto osseo in cui gli approcci emulano ulteriormente le caratteristiche nanostrutturali naturali dell'osso quando si usano la fibrina e altri nanomateriali.

Le ricerche hanno dimostrato che l'incorporazione di cellule osteogeniche e/o fattori biologici in una matrice di fibrina promuove la guarigione delle ossa. D'altra parte, è stato documentato che quando le cellule osteogeniche sono state mescolate con la colla di fibrina, si è verificata una maggiore formazione ossea rispetto a una combinazione di cellule con liquidi, come soluzione salina tamponata con fosfato. Quindi, qui si può affermare che sia le impalcature che le cellule hanno ruoli critici nella rigenerazione ossea.

Giannini et al. hanno fornito prove di un miglioramento favorevole nella rigenerazione ossea, insieme a una riduzione delle infezioni e della durata delle degenze in ospedale sulla combinazione di frammenti ossei autologhi con una miscela di concentrati piastrinici e una colla di fibrina crioprecipitata.

Tayapongsak et al. hanno anche notato un'accelerazione della rivascolarizzazione e la stimolazione della crescita di fibroblasti e osteoblasti, quando si utilizza una colla di fibrina autologa nei difetti mandibolari degli esseri umani.

Segura-Castillo et al. hanno anche notato una notevole eliminazione del riassorbimento dell'innesto osseo nella ricostruzione di schisi alveolari quando si utilizza la colla di fibrina. Questo fenomeno ha consentito la formazione di un ponte tra i segmenti sani della mascella e l'innesto, che a sua volta ha migliorato l'integrazione dell'innesto facilitando la migrazione cellulare.

Huh et al. hanno usato colla fibrinica autologa arricchita di piastrine (in cui fibrinogeno e trombina sono stati concentrati dal plasma ricco di piastrine anziché dall'intero plasma) per migliorare la capacità di rigenerazione ossea dell'osso particellare autogeno durante la riparazione dei difetti della mandibola nei cani ibridi.

Gli stessi autori, nei loro studi successivi, hanno dimostrato che l'aggiunta di colla di fibrina ricca di piastrine agli innesti ossei autologhi ha anche migliorato efficacemente la cresta alveolare verticale.

La colla di fibrina, quindi, sembra avere diversi vantaggi sui biomateriali poiché stimola l'angiogenesi, promuove la formazione di tessuto connettivale e facilita la guarigione (*Pini Prato et al., 1983; Ali et al., 1986; Jabs et al., 1992*), aiutando anche il prevenire delle infezioni, come dimostrano gli studi condotti da *G. Fortunato, E. Marini, F. Valdinucci e E. Bonucci* sulla formazione di osso attraverso l'utilizzo di idrossiapatite e fibrina sigillante in chirurgia ricostruttiva craniofacciale.

Questi studi dimostrano come, a distanza di anni, l'innesto di idrossiapatite e fibrina determini la formazione di un osso spongioso e compatto e ne confermano pertanto le sue proprietà osteoconduttive e osteoinduttive.

La fibrina diventa, infine, fondamentale nel facilitare le procedure chirurgiche trasformando la polvere di idrossiapatite in una pasta che aumenta, adattandosi e modellandosi al difetto osseo, la maneggevolezza dell'innesto da parte del chirurgo.

7.2. *Protocollo di utilizzo e di conservazione della fibrina sigillante*

Il sistema sterile Duploject è costituito da un supporto per due siringhe monouso (**N.1:** Tissucol – aprotinina (fibrinogeno); **N.2:** trombina), di ugual volume (1 ml) con un unico pistone. Una volta aperta la confezione, è necessario inserire il pistone e spingere fino al raggiungimento di egual volume in entrambe le siringhe. Solo a questo punto si può togliere il tappo di protezione (assicurandosi di poggiarlo dallo stesso verso con cui è stato tolto e con cui dovrà essere reinserito), e procedere con la diluizione.

Tre concetti chiave da sapere:

- Conservare in freezer a -20° dall'arrivo fino al primo utilizzo (per un periodo massimo di 2 anni).
- Prima di usarla, scongelarla a temperatura ambiente almeno 1h prima (in caso di emergenza si consiglia di scongelare e riscaldare i due componenti collanti utilizzando un bagnomaria sterile a temperatura di 33 – 37°C.)
- Una volta scongelata dev'essere conservata a temperatura ambiente per un periodo massimo di 3 settimane.

(**N.B.:** non è possibile congelarla e scongelarla nuovamente!)

È pronto per l'applicazione non appena la soluzione di Tissucol presenta, dopo lo scongelamento, una consistenza viscosa (quando si capovolge il sistema di applicazione, una bollicina d'aria sale lentamente nella siringa contenente la soluzione di Tissucol). Se la consistenza è simile ad un gel si deve presumere che il Tissucol si sia deteriorato in seguito ad una non corretta conservazione. In questo caso non può essere più utilizzato.

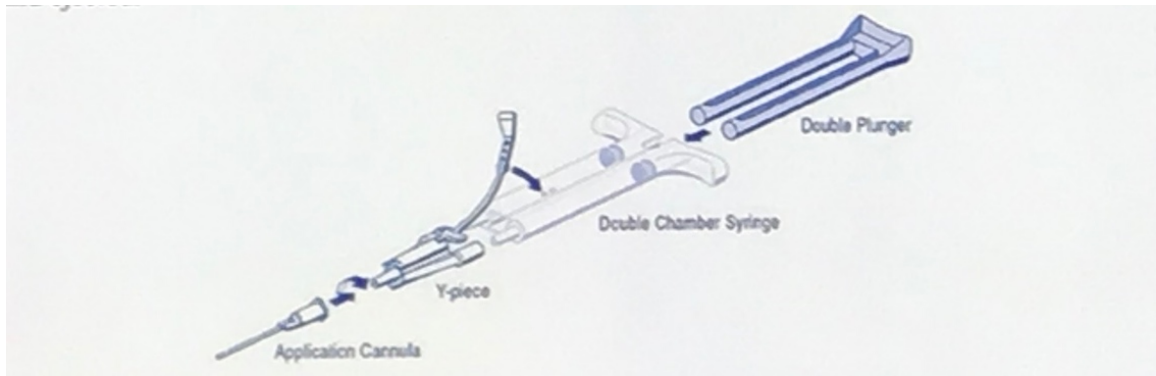


Figura.15 Schema esplicativo dei componenti del Duploject

- DILUIZIONE
 - I. Rimuovere con una siringa da 10 ml tutta la trombina (1 ml) dalla siringa n.2 del tisseel e metterla in una bowl di vetro.
 - II. Con un'altra siringa prelevare 9 ml di fisiologica e metterla nella stessa bowl in cui è stata messa la trombina. Mescolare il tutto con un Prichard fino a quando la schiuma (trombina) non sarà completamente scomparsa. **(Diluizione della trombina da 500 UI → 50 UI. Se necessario, diluire un'ulteriore volta da 50 UI a 5 UI per avere tempi di lavoro più lunghi)**

- III. Prelevare con una siringa 1 ml della soluzione mescolata (trombina alla nuova concentrazione) e reinserirla nella componente n.2 del tisseel.
- IV. Reinserire il tappo di protezione nel verso giusto.

Una volta diluita:

- V. Togliere il tappo di protezione e inserire il device ad Y contenuto nella confezione sterile e assicurarsi di inserirlo con il corretto incastro nei due buchini presenti sul tisseel.
- VI. Inserire l'ago e procedere con l'applicazione. Il duplojet è pronto all'uso.
- VII. Da un'altra parte prendere il Gen-Oss e idratarlo con qualche goccia di fisiologica.
- VIII. Una volta idratato aggiungere al materiale la colla di fibrina: bastano poche gocce (5/6), deve acquisire un aspetto di sabbia bagnata, traslucido.
- IX. Applicare e modellare il biomateriale nel difetto osseo un po' alla volta con un Prichard.
- X. Se necessario usare una membrana di collagene (ad esempio se l'innesto si trova al di fuori del difetto osseo): bagnare la membrana con qualche goccia di colla di fibrina e posizionarla sull'innesto.
- XI. Modellare a proprio piacimento.
- XII. Aspettare la polimerizzazione (circa 5 minuti) e suturare.
- XIII. È possibile applicare la colla di fibrina sulle suture a protezione di queste ultime (**immobilizzazione + impermeabilità**).
- XIV. Finito l'intervento riporre il tisseel con il proprio tappo di protezione a temperatura ambiente.

PARTE SPERIMENTALE

1. Introduzione

In seguito all'estrazione dell'elemento dentale, l'alveolo post-estrattivo subisce molteplici cambiamenti morfologici e dimensionali che portano ad un significativo riassorbimento osseo della cresta alveolare nel sito edentulo. La riabilitazione implantare in un paziente con difetti di cresta orizzontali e/o verticali diventa oggi sempre più comune per cui l'attenzione dei ricercatori e dei clinici si è orientata negli ultimi anni nello studio di nuove tecniche e nell'utilizzo di biomateriali che potessero aiutare il clinico nella rigenerazione delle creste atrofiche e nella futura riabilitazione implantare del paziente.

Le interazioni biologiche che si verificano nell'interfaccia osso-biomateriale sono fondamentali per il successo clinico a lungo termine dell'intervento rigenerativo. Recentemente i biomateriali sono stati associati all'uso della colla di fibrina per aumentarne le proprietà osteoconduttive e osteoinduttive.

I sigillanti a base di fibrina derivati dal plasma umano sono stati utilizzati in numerosi interventi chirurgici (addominale, toracico, vascolare, orale, endoscopico) al fine di migliorare la guarigione delle ferite, l'adesione dei tessuti e la coagulazione del sangue. La colla di fibrina umana (FG), utilizzata in questo studio, imita l'ultimo passaggio della cascata della coagulazione attraverso l'attivazione del fibrinogeno da parte della trombina, causando un coagulo di fibrina con proprietà adesive. FG potrebbe essere usata come *scaffold* per le cellule dell'osso per la sua biocompatibilità, degradazione biologica e proprietà di attrazione cellulare. Essa contiene fattori come trombina, fibrina, fibronectina e PDGF, che sono noti per conservare le attività biologiche, quali proliferazione e differenziazione cellulare, stimolando la guarigione delle ferite e agendo da impalcatura per la proliferazione delle cellule mesenchimali ed endoteliali. Tra le sue azioni esclusive, inoltre, evidenziamo la sua capacità di realizzare, una volta miscelata con i granuli ossei del biomateriale scelto, un composto pastoso che favorisce l'inserimento del graft nel difetto osseo e la successiva fissazione di membrane senza il bisogno di suturarle o di fissarle con pin in titanio. Per quanto

appena detto, assume un ruolo determinante nel facilitare la manipolazione del graft e nell'aiutare il chirurgo durante l'intervento.

2. Obiettivo

Lo scopo di questo studio è stato quello di valutare l'uso combinato di colla di fibrina arricchita di osso cortico-spongioso suino collagenato al 20% e associata all'uso di membrana in collagene per l'incremento di osso alveolare verticale in creste atrofiche.

3. Materiali e metodi

In questo *case report* è stato arruolato, previo consenso informato, un paziente di 47 anni che non presentava patologie attive e non prendeva farmaci che potessero interferire con il metabolismo osseo.

Il paziente presentava in arcata un ponte da 2.4 a 2.6 e una corona protesica sull'elemento 2.7. Gli elementi 2.4, 2.6 e 2.7 presentavano lesioni periapicali con elementi radicolari fortemente compromessi e pertanto destinati all'estrazione.



Figura 16. Radiografia pre-operatoria (2.4 - 2.7)

Dall'indagine radiografica (Cone Beam CT) sono emersi difetti ossei verticali in zona 2.4 e 2.7.

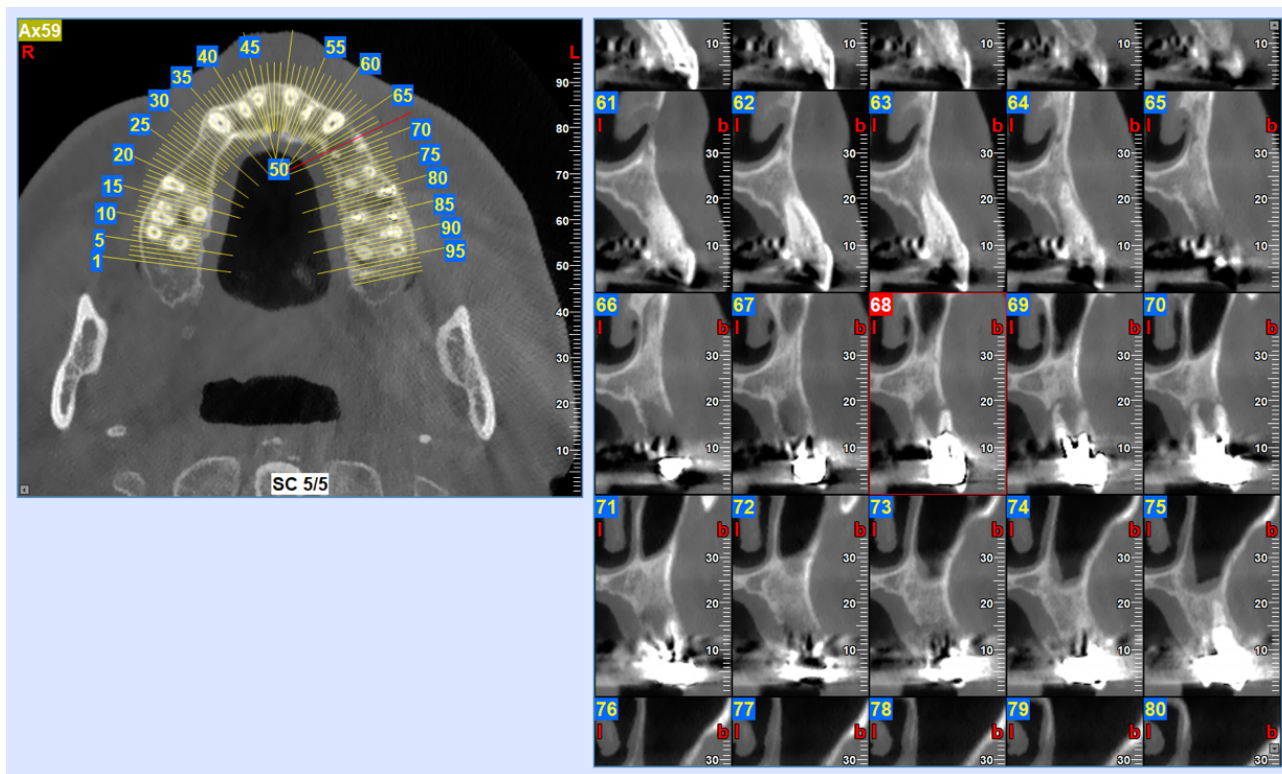


Figura 17. *CBCT della sezione del 2.4*

Il piano di trattamento prevedeva, in una prima fase l'estrazione degli elementi 2.4 e 2.7 con contestuale rigenerazione ossea e preparazione del provvisorio per gli elementi 2.4, 2.5 e 2.6 e, dopo circa 60 giorni, l'inserimento degli impianti in zona 2.4 e 2.7.

La seconda fase prevedeva l'estrazione dell'elemento 2.6, con contestuale rigenerazione ossea e preparazione di un ponte provvisorio sugli elementi 2.4, 2.5, 2.6 e 2.7.

Il piano di trattamento si concludeva con l'inserimento dell'impianto in zona 2.6 e la consegna di una protesi definitiva.

Un'ora prima dell'intervento chirurgico, il paziente ha ricevuto 2 gr di amoxicillina e acido clavulanico e, prima dell'intervento, è stato eseguito uno sciacquo con

collutorio allo 0,2% di clorexidina per 2 minuti. Inoltre, è stata prescritta terapia antibiotica con 1 g di amoxicillina due volte al giorno per 5 giorni.

Dopo aver eseguito l'anestesia plessica con Articaina, 40 mg/ml 1:100.000, il dente 2.4 è stato estratto e con un cucchiaio alveolare è stato asportato tutto il tessuto infiammatorio. Nella zona postestrattiva è stato rilevato un difetto osseo verticale (corticale ossea linguale e osso mesiale presenti), con deficit della parete corticale vestibolare e annessa fenestrazione. Per questo motivo, al fine di ripristinare questo deficit, è stato eseguito un intervento di chirurgia rigenerativa.

È stata quindi utilizzata la colla di fibrina (Tiessel, Baxter), associata a granuli di osso cortico-spongioso collagenato di origine suina (Gen-Os® della OsteoBiol) e membrana in collagene (Evolution® della OsteoBiol). La colla di fibrina, dopo essere stata diluita, è stata impiegata secondo il protocollo precedentemente descritto, unita al Gen-Os. Successivamente il materiale ottenuto è stato inserito nel difetto e coperto con la membrana in collagene, fissata con la stessa colla di fibrina. Infine, i lembi sono stati suturati con suture singole, utilizzando una sutura sintetica non riassorbibile in poliammide 4/0 (Supramid), per favorire una guarigione per seconda intenzione.

Il medesimo intervento, di estrazione e rigenerazione, è stato poi effettuato in zona 2.7, utilizzando gli stessi materiali.

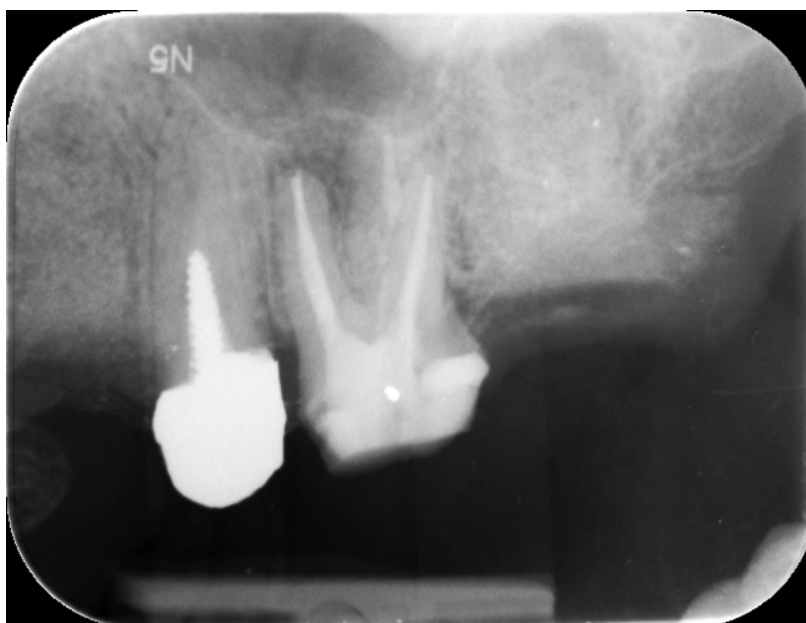


Figura 18. *Radiografia post-operatoria*

Dopo 1 settimana, i punti di sutura sono stati rimossi e la guarigione dei tessuti molli si presentava buona.

Il paziente è stato controllato dopo 1 settimana, dopo 2 settimane dall'intervento e poi una volta al mese fino a 6 mesi dall'intervento. Durante questo periodo è stata notata un'ottima guarigione dei tessuti molli e, dal punto di vista radiografico, il biomateriale inserito ha facilitato l'azione degli osteoblasti nella produzione di osso nel difetto.



Figura 19. *Controllo della guarigione su 2.4*

Dopo 60 giorni, sono stati inseriti 2 impianti della Nobel Biocare in zona 2.4 (3.5 x 13 mm) e 2.7 (4.3 x 8 mm). Al momento dell'inserimento nella zona dove è stata eseguita la terapia rigenerativa, è stato evidente lo stato di compattezza del tessuto rigenerato e il torque delle frese implantari è stato settato a 30 Ncm.

Sono state prelevate le scaglie di osso restanti nella fresa da preparazione per il sito implantare, al fine di effettuare una valutazione istologica.

Entrambi gli impianti sono stati posizionati a livello crestale, completamente inseriti all'interno nello spessore osseo.

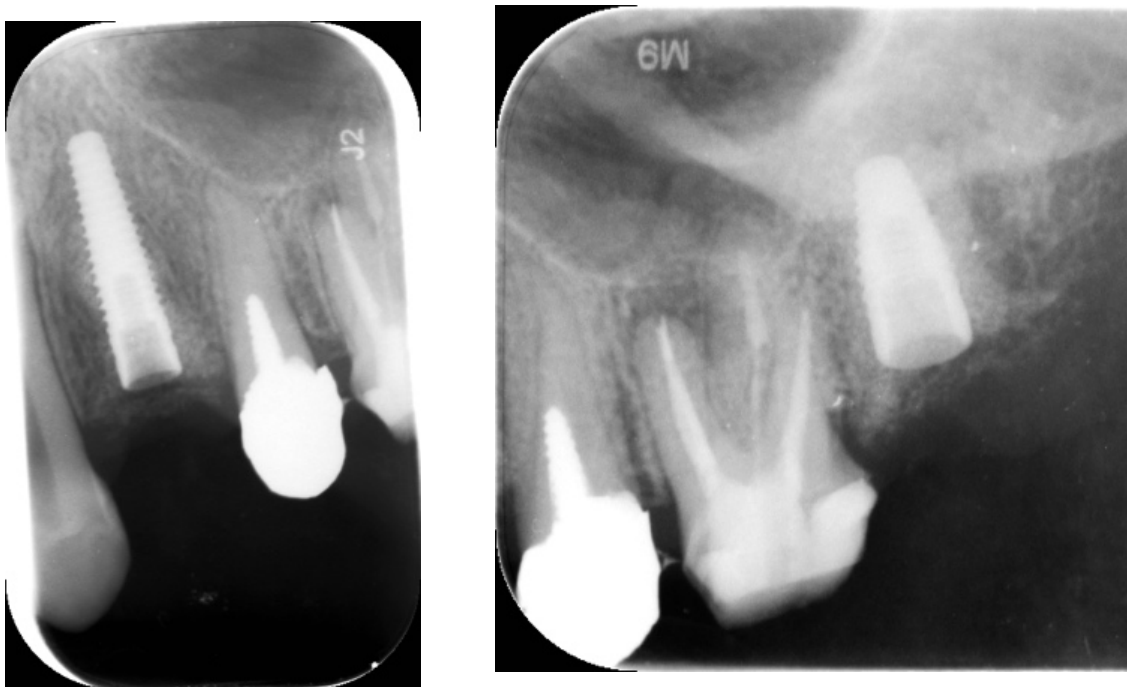


Figura 20. Radiografie successive all'inserimento implantare su 2.4 e 2.7

Dopo una settimana, sono state rimosse le suture ed effettuato il controllo della guarigione.

Il paziente è stato controllato poi ogni due mesi clinicamente e radiograficamente.

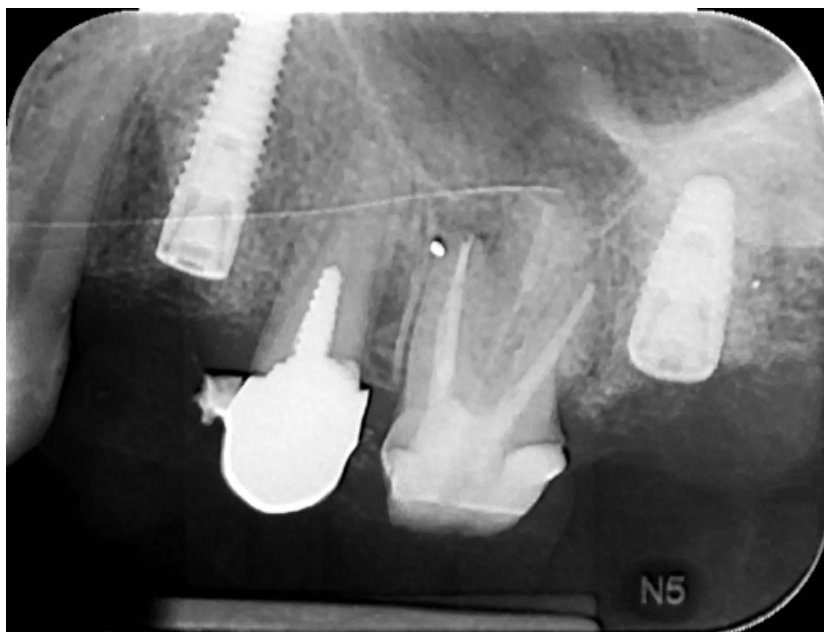


Figura 21. *Radiografia di controllo a 4 mesi*

Dopo circa 7 mesi dall'inserimento implantare sono state inserite le viti di guarigione sul 2.4 e sul 2.7 e in seguito avvitati i rispettivi MUA.

Il piano di trattamento del paziente, essendo ancora in corso, si concluderà successivamente con le fasi precedentemente descritte.

Valutazione istologica

Le scaglie d'osso prelevate sono state fissate in formalina al 10% per 24 ore e decalcificate usando acido etilendiamminotetraacetico al 4,13% (EDTA) (Sigma-Aldrich, Milano, Italia). Successivamente, sono state inglobate in paraffina ed è stata eseguita l'analisi immunoistochimica. Il campione è stato tagliato in sezioni longitudinali di 2 μm con il microtomo Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, Stati Uniti) e colorato con blu di toluidina e fucsina acida. È stato osservato e valutato al microscopio ottico Nikon Eclipse E600.

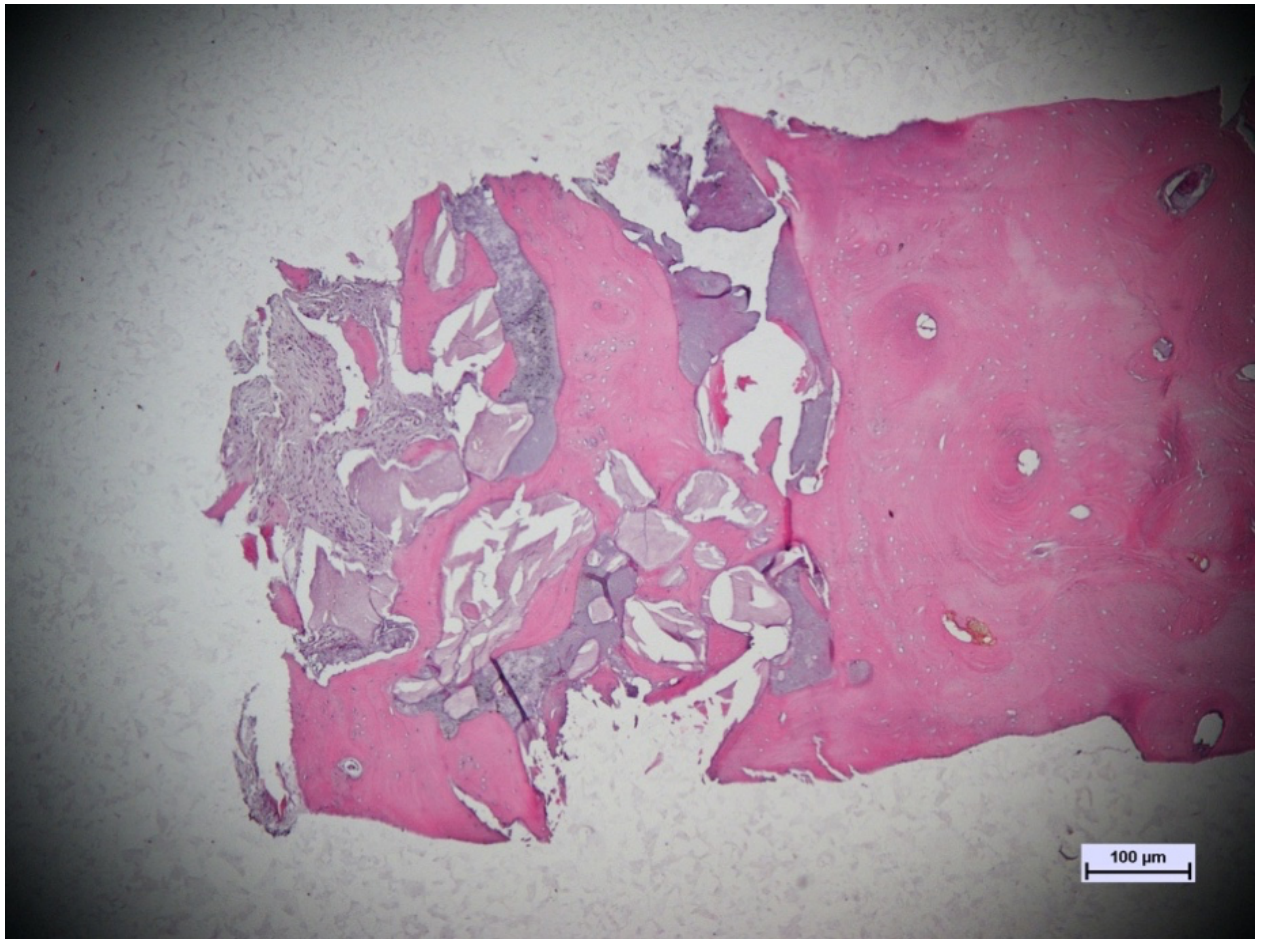


Figura 22. Immagini al microscopio ottico ad alto ingrandimento dell'area rigenerata; Ingrandimento originale di A: 10x; di B, C e D: 20x

4. Risultati

Gli interventi chirurgici eseguiti in questo studio sono stati condotti senza complicazioni.

Da un punto di vista radiografico, eseguito prima dell'inserimento implantare, il biomateriale inserito risulta integrato all'osso già esistente, con lieve presenza di granuli radiopachi.

Dal controllo radiografico effettuato a 4 mesi dall'intervento, si evidenzia in zona 2.7 intorno all'impianto un'area radiopaca, associabile alla zona rigenerata.

La cresta ossea non presenta deficit verticali nelle tre dimensioni.

Al momento dell'inserimento implantare, l'osso neoformato risulta avere una consistenza assolutamente superiore ai casi trattati normalmente con tecniche rigenerative senza colla di fibrina e la stabilità primaria dell'impianto risulta aumentata .

Da un punto di vista istologico, si nota la presenza di osso di nuova formazione, attorno a zone granulari, riferibili ai granuli di osso sintetico. Non si evidenziano zone infiammatorie. Sono visibili numerosi osteoblasti e strutture osteoniche ben distinte.

Dai dati ottenuti, quindi, l'utilizzo della colla di fibrina associata a osso eterologo e alla membrana in collagene favorisce la formazione di nuovo osso in difetti verticali, permettendo l'inserimento implantare laddove prima non fosse possibile. Questa tecnica rigenerativa può essere, pertanto, considerata un'ottima soluzione, dal momento che la colla di fibrina forma un coagulo addizionale, la cui degradazione, favorita dalla presenza delle cellule macrofagiche, determina il reclutamento e la differenziazione di molte popolazioni cellulari, tra cui le cellule osteoprogenitrici, stimola l'angiogenesi, promuove la formazione di nuovo tessuto osseo e facilita la guarigione migliorando quindi l'osteoiduzione.

5. Discussione

Un biomateriale ideale dovrebbe favorire i tre processi biologici che determinano la rigenerazione ossea, ovvero: apposizione di osso neo-formato, neo angiogenesi e riassorbimento progressivo dello scaffold, al fine di promuovere sufficiente neo formazione ossea per assicurare un adeguato mantenimento del volume.

Questi processi richiedono una continua e significativa interazione biologica tra i granuli del biomateriale e i tre tipi di cellule coinvolte.

A tutt'oggi il gold standard rimane l'osso autologo (OA) ma, date le forti limitazioni nella disponibilità di quest'ultimo l'industria delle biotecnologie ha sviluppato vari sostituti ossei che inizialmente lo hanno integrato come materiali complementari, per compensare la ridotta quantità reperibile mediante prelievi intraorali.

Sono stati ottenuti risultati promettenti miscelando gli xenoinnesti Single-Phase, ovvero di sola composizione minerale, con OA. Tuttavia, il riassorbimento lento e molto limitato di questi scaffold determinava elevate percentuali di biomateriale residuo al rientro, con conseguente ridotta percentuale di osso neoformato rispetto all'uso del solo OA.

Sull'altro fronte dello sviluppo di nuovi materiali, la maggior parte dei sostituti ossei sintetici ha dimostrato di essere rapidamente e completamente riassorbibili, con tuttavia un prezzo significativo da pagare in termini di mantenimento del volume.

La ricerca di un equilibrato compromesso tra mantenimento del volume, neoformazione ossea e un adeguato riassorbimento dell'innesto non è stato, quindi, un obiettivo facilmente raggiungibile nei primi anni della ricerca e dello sviluppo dei biomateriali e questo è il motivo per il quale le aziende di biotecnologie più innovative si sono concentrate sulla seconda generazione di xenoinnesti, che sono comunemente definiti biomateriali "Dual-Phase", a causa della loro matrice duale che associa sia componenti minerali che organici (collagene): la preservazione del collagene presente all'interno della originaria matrice ossea eterologa spongiosa e corticale, assieme a un mix ideale di questo particolato, permette di ottenere una risposta biologica eccellente da parte dei tessuti ossei riceventi, e nel contempo una adeguata preservazione del volume.

La preservazione del collagene, quindi diventa fondamentale in quanto quest'ultimo presenta alcuni vantaggi significativi per la rigenerazione ossea, tutti ben documentati scientificamente: stimola la differenziazione delle cellule staminali mesenchimali in osteoblasti, è chemiotattico ovvero attira gli osteoblasti quando viene rilasciato durante il processo di riassorbimento osteoclastico, favorendo la sostituzione dello scaffold riassorbito con osso neo-formato; inoltre il collagene stimola sia la neo angiogenesi che l'assorbimento e il successivo rilascio dei fattori di crescita.

Naturale replica dell'osso autologo, il Gen-Os (OsteoBiol), usato nel *case report*, ne conserva le medesime strutture intime (matrice e porosità) ed è caratterizzato da una elevata osteoconduttività. È un materiale biocompatibile e biodisponibile, gradualmente riassorbibile e svolge azione di supporto alla neoformazione ossea contribuendo a preservare la forma e il volume originario dell'innesto. Inoltre, grazie al contenuto di collagene, il prodotto agevola la formazione del coagulo ematico e la successiva invasione delle cellule riparatrici e rigenerative, favorendo la completa "restitutio ad integrum" del deficit osseo.

In questo studio, l'osso collagenato è stato miscelato con la colla di fibrina (Tiseel, Baxter) e posizionato nel difetto osseo verticale post-estrattivo durante l'intervento chirurgico.

La fibrina sigillante è costituita da un sistema bicomponente di fibrinogeno e trombina derivati dal plasma umano. Se miscelati insieme, questi componenti formano un coagulo di fibrina strutturale simile al coagulo fisiologico. La concentrazione di trombina determina sia la velocità di presa che la struttura del coagulo. Alte concentrazioni di trombina determinano una coagulazione rapida e una rete a maglie con fibrille sottili e piccole dimensioni dei pori, per questo motivo durante l'intervento chirurgico è stata effettuata una diluzione della trombina con fisiologica (da 500 UI a 50 UI) al fine di facilitare il chirurgo nella manipolazione del graft (mix di Gen-Os e colla di fibrina) nel difetto. Il meccanismo d'azione della fibrina sigillante si esplica mediante l'adesione rapida e permanente del graft ai tessuti e l'azione emostatica e biostimolante la rigenerazione tissutale. Essa determina un'impalcatura naturale che avvia l'emostasi e fornisce la matrice iniziale utile per l'adesione, la migrazione, la proliferazione e la differenziazione delle

cellulare promuovendo l'osteoiduzione e migliorando le proprietà ostoconduttive del biomateriale usato.

La colla di fibrina, per tutte le proprietà appena descritte ma soprattutto per la sua capacità fissante, è stata poi usata anche per l'applicazione della membrana in collagene a copertura del difetto, durante l'intervento chirurgico.

6. Conclusioni

L'applicazione combinata di biomateriali collagenati, colla di fibrina e membrane compatibili con l'esposizione e con la crescita di epitelio a scorrimento, rappresenta una tecnica predicibile per ottenere una rigenerazione ossea anche in condizione di gravi atrofie; la *conditio sine qua non* rimane l'assenza totale di elementi di disturbo della guarigione, come protesi totali rimovibili o in genere mobili (protesi scheletrate o protesi in resina) che comprimendo le strutture, di fatto, disturbano il normale processo di stabilizzazione del coagulo e la maturazione di tessuti duri rigenerati.

La colla di fibrina, quindi, sembra avere diversi vantaggi sui biomateriali poiché stimola l'angiogenesi, promuove la formazione di tessuto osseo e facilita la guarigione e diventa, inoltre, fondamentale nel facilitare le procedure chirurgiche trasformando i granuli di osso in una pasta che aumenta, adattandosi e modellandosi al difetto osseo, la maneggevolezza dell'innesto da parte del chirurgo.

Il presente *case report* dimostra, concludendo, che l'incorporazione di cellule osteogeniche e/o fattori biologici in una matrice di fibrina mediante questa pratica chirurgica promuove la guarigione e la riduzione dei difetti ossei aumentando efficacemente l'altezza della cresta ossea verticale, permettendo l'inserimento implantare e consentendo un ottimo livello di osteointegrazione.

BIBLIOGRAFIA

- Abiraman S, Varma HK, Umashankar PR, John A. *Fibrin glue as an osteoinductive protein in a mouse model. Biomaterials.* 2002 Jul;23(14):3023-31
- Albrektsson T, Bach A, Edshage S, Jönsson A. *Fibrin adhesive system (FAS) influence on bone healing rate: a microradiographical evaluation using the bone growth chamber.* Acta Orthop Scand. 1982 Oct;53(5):757-63.
- Alving BM, Weinstein MJ, Finlayson JS, Menitove JE, Fratantoni JC. *Fibrin sealant: summary of a conference on characteristics and clinical uses.* Transfusion. 1995 Sep;35(9):783-90.
- Amler M H, *The time sequence of tissue regeneration in human extraction wounds.* Oral Surgery, Oral Medicine and Oral Pathology 1969; 27:309-318
- Arnaud E (2000). *Advances in cranioplasty with osteoinductive biomaterials: summary of experimental studies and clinical projects.* Child's Nerv Syst 16: 659- 668.
- Aubin JE, Gupta AK, Zirngibl R, Rossant j: *Knockout mice lacking bone sialoprotein expression have bone abnormalities.* J Bone Miner Res 1996; (11): S102
- Bani D. *Il tessuto osseo.* Idelson-Gnocchi 2004
- Barone A1, Aldini NN, Fini M, Giardino R, Calvo Guirado JL, Covani U. *J Periodontol Xenograft versus extraction alone for ridge preservation after tooth removal: a clinical and histomorphometric study.* 2008 Aug;79(8):1370-7. doi: 10.1902/jop.2008.070628
- Bösch P, Braun F, Eschberger J (1977). *Die Beeinflussung der Knochenheilung durch hochkonzentriertes Fibrin. Experimentelle Untersuchung am Kaninchen. (The influence of highly concentrated fibrin on bone repair. An experimental investigation in the rabbit).* Arch Orthop Unfall Chir 89:259-273.
- Bronckers AL, Farach-Carson MC, Van Waveren E, Butler WT. *Immunolocalization of osteopontin, osteocalcin, and dentin sialoprotein during dental root formation and early cementogenesis in the rat.* J Bone Miner Res. 1994 Jun;9(6):833-41.
- Bruder SP, Jaiswal N, Ricalton NS, Mosca JD, Kraus KH, Kadiyala S. *Mesenchymal stem cells in osteobiology and applied bone regeneration.* Clin Orthop Relat Res. 1998 Oct;(355 Suppl):S247-56. Review.

- Buckwalter J.A., M. J. Glimcher, R. R. Cooper And R. Recker *Bone Biology J Bone Joint Surg Am.* 1995;77:1256-1275.
- Canalis E, Centrella M, McCarthy T. *Effects of basic fibroblast growth factor on bone formation in vitro.* J Clin Invest. 1988 May;81(5):1572-7.
- Chiapasco M. *Manuale illustrato di chirurgia orale.* Masson 2002
- Daculsi G, Bagot d'Arc M, Corlieu P, Gersdorff M (1992) *Macroporous biphasic calcium phosphate efficiency in mastoid cavity obliteration: experimental and clinical findings.* Ann Otol Rhinol Laryngol 101: 669-674.
- Dahlin C, Linde A, Gottlow J, Nyman S. *Healing of bone defects by guided tissue regeneration.* 1998
- Delmas PD, Malaval L In: Mundy GR, Martin TJ, ed. *Handbook of experimental pharmacology. Physiology and pharmacology of bone differ from the matrix of intramembranous bone.* Calcif Tissue In 1993; 49. 349-354
- Di Stefano DA, Cazzaniga A, *Chirurgia ossea ricostruttiva pre e perimplantare.* Elsevier Masson, Milano, 2008.
- Docquier PL, Delloye C. *Treatment of Aneurysmal Bone Cysts by Introduction of Demineralized Bone and Autogenous Bone Marrow.* JBJS 2005
- Ducy P, Desbois C, Boyce B, Pinero G, Story B, Dunstan C, Smith E, Bonadio J, Goldstein S, Gundberg C, Bradley A, Karsenty G. *Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice.* 1996
- Dunn CJ, Goa KL. *Fibrin sealant: a review of its use in surgery and endoscopy.* Drugs. 1999 Nov;58(5):863-86. Review.
- Ereno C, Guimarães SA, Pasetto S, Herculano RD, Silva CP, Graeff CF, Tavano O, Baffa O, Kinoshita A. *Latex use as an occlusive membrane for guided bone regeneration.* J Biomed Mater Res A. 2010 Dec 1;95(3):932-9. doi: 10.1002/jbm.a.32919.
- Festa VM, Addabbo F, Laino L, Femiano F, Rullo R *Porcine-derived xenograft combined with a soft cortical membrane versus extraction alone for implant site development: a clinical study in humans.* Clin Implant Dent Relat Res. 2013 Oct;15(5):707-13. doi: 10.1111/j.1708-8208.2011.00398. x. Epub 2011 Nov 14.

Fortunato G, Marini E, Valdinucci F, Bonucci E (1997) *Long-term results of hydroxyapatite-fibrin sealant implantation in plastic and reconstructive craniofacial surgery*. J Cranio Maxillofacial Surg 25: 124-135.

Giannini G, Mauro V, Agostino T, Gianfranco B. *Use of autologous fibrin-platelet glue and bone fragments in maxillofacial surgery*. Transfus Apher Sci. 2004;30(2):139–144.

Hallman M, Cederlund A, Lindskog S, Lundgren S, Sennerby L (2001a) *A clinical histologic study of bovine hydroxyapatite in combination with autogenous bone and fibrin sealant for maxillary sinus floor augmentation. Results after 6 to 8 months of healing*. Clin Oral Impl Res 12: 135-143.

Hallman M, Lundgren S, Sennerby L (2001b) *Histologic analysis of clinical biopsies taken 6 months and 3 years after maxillary sinus floor augmentation with 80% bovine hydroxyapatite and 20% autogenous bone mixed with fibrin sealant*. Clin Impl Dent Rel Res 3: 87-96.

Hammerle CHF, Jung RE, Yaman D, Lang NP. *Ridge augmentation by applying bioresorbable membranes and deproteinized bovine bone mineral: A report of twelve consecutive cases*. Clin Oral Implants Res 2008.

Holtrop ME: *Light and electron microscopic structure of bone-forming cells*. In: Hall BK, ed. Bone: the osteoblast and osteocyte. Telford Press 1990.

Huh J-Y, Choi B-H, Zhu S-J, Jung J-H, Kim B-Y, Lee S-H. *The effect of platelet-enriched fibrin glue on bone regeneration in autogenous bone grafts*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2006;101(4):426–431.

II International Consensus Conference on Biomaterials, Chester, Inghilterra 1991.

Isogai N, Landis WJ, Mori R, Gotoh Y, Gerstenfeld LC, Upton J, Vacanti JP. *Experimental use of fibrin glue to induce site-directed osteogenesis from cultured periosteal cells*. Plast Reconstr Surg. 2000 Mar;105(3):953-63.

Jegoux F, Goyenvallée E, Bagot d'Arc M, Aguado E, Daculsi G (2004) *In vivo biological performance of composites combining micro-macroporous biphasic calcium phosphate granules and fibrin sealant*. Arch Orthop Trauma Surg, in press. .

Kalfas IH. F.A.C.S. *Principles of bone healing*, 2001.

- Kania R, Meunier A, Hamadouche M, Sedel L, Petite H (1998) *Addition of fibrin sealant to ceramic promotes bone repair: long term study in rabbit femoral defect model*. J Biomed Mater Res (Appl Biomater) 43: 38-45.
- Karimbux NY, Rosenblum ND, Nishimura I. *Site-specific expression of collagen I and XII mRNAs in the rat periodontal ligament at two developmental stages*. J Dent Res. 1992 Jul;71(7):1355-62.
- Khan SN, Cammisa FP Jr, Sandhu HS, Diwan AD, Girardi FP, Lane JM. *The biology of bone grafting*. J Am Acad Orthop Surg. Jan-Feb 2005;13(1):77-86.
- Koolwijk P, van Erck MG, de Vree WJ, Vermeer MA, Weich HA, Hanemaaijer R (1996) *Cooperative effect of TNF-alpha, bFGF, and VEGF on the formation of tubular structures of human microvascular endothelial cells in a fibrin matrix. Role of urokinase activity*. J Cell Biol 132: 1177-1188.
- Le Guehennec L, Goyenvalle E., Aguado E., Pilet P., Bagot d'Arc M., Daculsi G. (2004) *MBCP[®] biphasic calcium phosphate granules and Tissucol[®] fibrin sealant in rabbit femoral defects: The effect of fibrin on bone ingrowth*. J Mater Sci Mater Med, in press.
- Le Nihouannen, Afchine Saffarzadeh, Eric Aguado, Eric Goyenvalle, Olivier Gauthier Franc, Francoise Moreau, Paul Pilet, Reiner Spaethe, Guy Daculsi, Pierre Layrolle. *Osteogenic properties of calcium phosphate ceramics and fibrin glue based composites*. 2007.
- Lekholm U, Zarb GA. Patient selection and preparation. In Branemark PI, Zarb GA, Albrektsson T. editors. *Tissue integrated prostheses: osseointegration in clinical dentistry*. Quintessence, Chicago 1985;199-209.
- Lekovic V, Camargo P, Weinlaender M, Vasilic N, Djordjevic M, Kenney E (2001) *The use of bovine porous bone mineral in combination with enamel matrix proteins or with autologous fibrinogen/fibronectin system in the treatment of intrabony periodontal defects in humans*. J Periodontol 72: 1157-1163.
- Materiali e Tecnologie Odontostomatologiche*, a cura dei Docenti di Materiali Dentari e Tecnologie Protetiche e di Laboratorio delle Università Italiane. Referente di Disciplina, Giuseppe Spoto.
- Matras H. *Fibrin seal: the state of the art*. J Oral Maxillofac Surg. 1985 Aug;43(8):605-11
- McKee MD, Farach-Carson MC, Butler WT, Hauschka PV, Nanci A. *Ultrastructural immunolocalization of noncollagenous (osteopontin and osteocalcin) and plasma (albumin and alpha 2HS-glycoprotein) proteins in rat bone*. J Bone Miner Res. 1993 Apr; 8(4):485-96.

- Misch CE, Judy KW. *Classification of partially edentulous arches for implant dentistry*. Int J Oral Implantol. 1985; 4(2):7-13.
- Misch CE. *Bone classification, training keys to implant success*. Dent Today. 1989 May; 8(4):39-44
- Nakamura K, Koshino T, Saito T (1998) *Osteogenic response of the rabbit femur to a Hydroxyapatite thermal decomposition product fibrin sealant mixture*. Biomaterials 19: 1901-1907.
- Noori A, Ashrafi SJ, Vaez-Ghaemi R, Hatamian-Zaremi A, Webster TJ. *A review of fibrin and fibrin composites for bone tissue engineering*. Int J Nanomedicine. 2017 Jul 12;12:4937-4961. doi: 10.2147/IJN.S124671. eCollection 2017.
- Norton MR, Gamble C. *Bone classification: an objective scale of bone density using the computerized tomography scan*. Clin Oral Implants Res. 2001 Feb;12(1):79-84.
- Perka C, Schultz O, Spitzer RS, Lindenhayn K, Burmester GR, Sittinger M. *Segmental bone repair by tissue-engineered periosteal cell transplants with bioresorbable fleece and fibrin scaffolds in rabbits*. Biomaterials. 2000 Jun;21(11):1145-53.
- Peters Christopher L, Jerod L, Hines Kent N, Bachus Marcis A, Craig Roy D, Bloebaum. *Biological effects of calcium sulfate as a bone graft substitute in ovine metaphyseal defects*. Journal of Biomedical Materials Research Part A. 2006
- Radosevich M, Goubran HI, Burnouf T. *Fibrin sealant: scientific rationale, production methods, properties, and current clinical use*. Vox Sang. 1997;72(3):133-43. Review.
- Re S, Corrente G, Abundo R, Cardarapoli D (2002) *Orthodontic movement into bone defects augmented with bovine bone mineral and fibrin sealer: a reentry case report*. Int J Periodontics Rest Dent 22: 139-145.
- Reddy SV, Roodman GD. *Control of osteoclast differentiation*. Crit Rev Eukaryot Gene Expr. 1998;8(1):1-17. Review.
- Rengachary SS.: *Bone Morphogenetic Proteins: basic concepts*. Neurosurg Focus. 2002; (13): 1-6.
- Robbins e Cotran. *Le basi patologiche delle malattie*. Patologia generale.
- Rosati P., Columbo R., Maraldi N. *Istologia*. EdiErmes 2006.

Rosemberg AE. In ed. *Robbins Pathologic basis of disease*, 1994.

Sabattini VB. *Tecniche ricostruttive e rigenerative dei mascellari atrofici. I biomateriali: scelta, indicazioni e metodi di uso: lo stato dell'arte*. TU.E. OR Edizioni. 2007

Schmoekel H, Schense JC, Weber FE, Gratz KW, Gnagi D, Muller R, Hubbell JA (2004) *Bone healing in the rat and dog with non-glycosylated BMP-2 demonstrating low solubility in fibrin matrices*. J Ortop Res 22: 376-381.

Segura-Castillo JL, Aguirre-Camacho H, González-Ojeda A, Michel- Perez J. Reduction of bone resorption by the application of fibrin glue in the reconstruction of the alveolar cleft. *J Craniofac Surg*. 2005; 16(1):105–112.

Sen MK, Miclau T. *Autologous iliac crest bone graft*, Injury. 2007 Mar;38 Suppl 1:S75-80

Sodek J, McKee MD. *Molecular and cellular biology of alveolar bone*. *Periodontol* 2000. Oct; 24:99-126. Review.

Sodek J, Overall CM. *Matrix metalloproteinases in periodontal tissue remodeling*. Matrix Suppl. 1992; 1:352-62. Review.

Sodek J., Ganss B., McKee M.D. (1999) *Osteopontin*. Crit. Rev. Oral Biol. Med. 10: 79-98

Sohn DS, Huang B, Kim J, Park E, Park CC. *Utilization of Autologous Concentrated Growth Factors (CGF) Enriched Bone Graft Matrix (Sticky Bone) and CGF-Enriched Fibrin Membrane in Implant Dentistry*. The Journal of Implant & Advanced Clinical Dentistry, 2015 Vol 7, No 10

Stein JM, Fickl S, Yekta SS, et al. *Clinical evaluation of a biphasic calcium composite grafting material in the treatment of human periodontal intrabony defects: a 12 month randomized controlled clinical trial*. J Periodontol. 2009 Nov; 80(11): 1774-82.)

Takahashi S, Goldring S, Katz M, Hilsenbeck S, Williams R, Roodman GD. *Downregulation of calcitonin receptor mRNA expression by calcitonin during human osteoclast-like cell differentiation*. J Clin Invest. 1995 Jan;95(1):167-71.

Takei A, Tashiro Y, Nakashima Y, Sueishi K (1995) *Effects of fibrin on the angiogenesis in vitro of bovine endothelial cells in collagen gel*. In Vitro Cell Dev Biol Anim **31**: 467-472.

- Tayapongsak P, O'Brien DA, Monteiro CB, Arceo-Diaz LY. *Autologous fibrin adhesive in mandibular reconstruction with particulate cancellous bone and marrow*. J Oral Maxillofac Surg. 1994;52(2): 161–165.
- Tiedeman JJ, Garvin KL, Kile TA, Connolly JF. *The Role of a Composite, Demineralized Bone Matrix And Bone Marrow In The Treatment Of Osseous Defects* MD Orthopedics. 1995.
- Tirone F, Salzano S, Pagano M. Int J Periodontics Restorative Dent 2018 Mar 7 *Histologic and Radiographic Analysis of Nonhealing Extraction Sockets Treated with Bio-Oss Collagen After a 4-Month Healing Period: A Prospective Descriptive Study in Humans*.
- Tolstunov et al. *Bone Augmentation Techniques for Horizontal and Vertical Alveolar Ridge Deficiency in Oral Implantology*, 2019.
- Trisi P, Rao W. *Bone classification: clinical-histomorphometric comparison.*, 1999.
- Tynan JR, Schachar NS, Marshall GB, Gray RR. *Pathologic Fracture Through a Unicameral Bone Cyst of the Pelvis: CT-guided Percutaneous Curettage, Biopsy, and Bone Matrix Injection*. Journal of Vascular and Interventional Radiology Volume 16, Issue 2, Part 1, February 2005
- Waltimo J, Lukinmaa PL *Immunohistochemical localization of types I, V, and VI collagen in human permanent teeth and periodontal ligament*. J Dent Res. 1992 Feb;71(2):391-7.
- Wittkamp A (1989) *Fibrin sealant as sealant for hydroxyapatite granules*. J Cranio Max-Fac Surg 17: 179-181.
- Yamada Y, Boo JS, Ozawa R, Nagasaka T, Okazaki Y, Hata K, Ueda M. *Bone regeneration following injection of mesenchymal stem cells and fibrin glue with a biodegradable scaffold*. J Craniomaxillofac Surg. 2003 Feb;31(1):27-33.

RINGRAZIAMENTI

Vorrei ringraziare il Professor Fabrizio Bambini e la Dottoressa Giulia Orilisi che mi hanno aiutata nella realizzazione della tesi dedicandomi tempo e preziosi consigli.

Desidero inoltre ringraziare il Dott. Enzo Foti per la sua disponibilità e per avermi permesso di partecipare ai suoi corsi sulla colla di fibrina, oggetto della mia tesi.