



UNIVERSITA' POLITECNICA DELLE MARCHE

Facoltà di Medicina e Chirurgia

Corso di Laurea in Odontoiatria e Protesi Dentaria

Presidente: Prof. Maurizio Procaccini

UN NUOVO PROTOCOLLO CHIRURGICO PER

L'AUMENTO ORIZZONTALE DI CRESTA:

SIMPLIFIED APPPOSITION TECHNIQUE

Relatore: Chiar.mo

Prof. Fabrizio Bambini

Tesi di Laurea di:

Umberto Rossi

Anno Accademico 2019-2020

INDICE

SOMMARIO

INTRODUZIONE

1. MODIFICHE QUALITATIVE E QUANTITATIVE FISIOLOGICHE NELL'ALVEOLO POST-ESTRATTIVO

- 1.1 PRINCIPI BIOLOGICI DEL TESSUTO OSSEO**
- 1.2 PRINCIPI BIOLOGICI DELLA GUARIGIONE**
- 1.3 RIMODELLAMENTO DELL'OSSO ALVEOLARE NELL'ALVEOLO
POST-ESTRATTIVO**

2. PRINCIPI BIOLOGICI DELLA RIGENERAZIONE OSSEA

- 2.1 BIOMATERIALI PER LA CHIRURGIA RIGENERATIVA**
- 2.2 COLLA DI FIBRINA**
- 2.3 MEMBRANE**

3. HORIZONTAL RIDGE AUGMENTATION: TECNICHE OPERATIVE

- 3.1 GBR**
- 3.2 ESPANSIONE DI CRESTA**
- 3.3 INNESTI DI BLOCCHI OSSEI**

4. PARTE SPERIMENTALE

4.1 INTRODUZIONE

4.2 OBIETTIVI

4.3 MATERIALI E METODI

4.3.1 Protocollo chirurgico

4.3.2 Valutazione radiografica: CBCT

4.3.3 Valutazione istologica

5. RISULTATI

6. DISCUSSIONE

7. CONCLUSIONI

8. BIBLIOGRAFIA

9. RINGRAZIAMENTI

SOMMARIO

L'argomento di questa tesi sperimentale riguarda lo studio delle alterazioni tridimensionali relative alla quota di aumento nella cresta alveolare che avvengono in seguito all'applicazione di una nuova tecnica chirurgica minimamente invasiva chiamata "Simplified Apposition Technique" (S.A.T), che prevede l'uso di osso bovino deproteinizzato, colla di fibrina umana e membrana in collagene, in associazione ai fattori di guarigione liberati dall'alveolo post-estrattivo.

La tesi è stata strutturata in quattro parti. Nella prima parte viene descritta l'anatomia, la fisiologia e l'istologia del tessuto osseo ed analizzati i processi di guarigione, sottolineando l'importanza della cascata coagulativa e dei fattori di guarigione liberati. Inoltre, vengono descritte le alterazioni dell'osso basale e del processo alveolare in seguito a estrazione dentaria. Nella seconda parte vengono descritti i principi biologici della rigenerazione ossea, parlando in generale dei biomateriali di uso comune nelle tecniche rigenerative attuali, e soffermandosi più in dettaglio sui materiali usati nella tecnica descritta in questa tesi sperimentale.

Nella terza parte viene effettuata una digressione sulle tecniche impiegate per effettuare aumenti orizzontali di cresta nel corso negli anni.

La quarta parte, invece, consiste nella vera e propria parte sperimentale. In particolare, vengono illustrati: lo scopo della ricerca, i materiali e metodi, i risultati ottenuti *in vitro* dall'analisi dei prelievi istologici analizzati e la discussione degli stessi, al fine di trarre delle conclusioni che possano essere traslate nella pratica clinica.

INTRODUZIONE

La riabilitazione di edentulie parziali o totali tramite l'inserimento di impianti osteointegrati è diventata ormai una modalità terapeutica ben consolidata nella pratica clinica quotidiana. Spesso però, il posizionamento degli impianti in una posizione ritenuta ideale per la protesi finale è spesso compromesso dal riassorbimento della cresta alveolare a seguito di estrazioni, avulsioni traumatiche, difetti parodontali o edentulie di lunga data. Dopo l'estrazione di un dente, infatti, si verificano cambiamenti morfologici e dimensionali della cresta alveolare con conseguente significativo riassorbimento e rimodellamento osseo tridimensionale. Gli studi in letteratura hanno riportato una riduzione della dimensione orizzontale della cresta in alveoli post-estrattivi che variano da 2,6 a 4,6 mm; mentre la riduzione verticale media dell'altezza della cresta è di circa 1,24 mm. Per questo motivo, il clinico deve spesso ricorrere ad una procedura chirurgica che abbia lo scopo di ottenere un aumento volumetrico della cresta ossea residua.

A tal proposito sono stati studiati e testati un gran numero di biomateriali di diversa composizione, ma l'innesto di osseo autologo è ancora considerato il gold standard perché combina proprietà osteogeniche, osteoinduttive e osteoconduttive. Tuttavia, è spesso associato a complicanze correlate al sito del prelievo e alla quantità limitata.

Studi recenti hanno dimostrato che l'innesto di alveoli post-estrattivi con xenoinnesti e l'uso di membrane barriera sono in grado di ridurre il grado di alterazioni dimensionali e di promuovere le procedure di aumento di cresta, grazie alle proprietà osteoconduttive e osteoinduttive. In associazione a questi, l'utilizzo della colla di fibrina umana fornisce ulteriori vantaggi nella pratica clinica, in quanto stabilizza e rinforza il coagulo, rende più maneggevole l'innesto e protegge la ferita chirurgica promuovendone la guarigione.

Sebbene il tema della "rigenerazione e conservazione di cresta" sia stato ampiamente dibattuto nella letteratura scientifica, stabilire linee guida chiare sui biomateriali e sulla tecnica da utilizzare per raggiungere risultati di trattamento predicibili rimane una sfida significativa nella pratica clinica.

A questo proposito, lo scopo di questo caso clinico è stato quello di validare scientificamente una nuova tecnica chirurgica mini-invasiva chiamata "Simplified Apposition Technique" (S.A.T). Questa tecnica consiste nell'uso di osso bovino (BO, Bio-Oss, Geistlich Biomaterials, Vicenza, Italia), colla di fibrina (HFG, Tisseel, Baxter, Deerfield, Illinois, Stati Uniti) e

membrana in collagene (CM, Bio-Gide compressed, Geistlich Biomaterials, Vicenza, Italia) in associazione con un alveolo post-estrattivo, al fine di ottenere un aumento della dimensione orizzontale della cresta con la formazione di nuovo tessuto duro. È stato effettuato un confronto tra la larghezza dell'osso, mediante l'uso di CBCT, prima dell'intervento chirurgico, dopo 11 mesi e dopo 2,5 anni di follow-up. Inoltre, la qualità ossea dopo 11 mesi di follow-up è stata valutata mediante analisi istologica.

1. MODIFICHE QUALITATIVE E QUANTITATIVE FISIOLOGICHE NELL'ALVEOLO POST ESTRATTIVO

1.1 PRINCIPI BIOLOGICI DEL TESSUTO OSSEO

L'osso è un tessuto connettivo specializzato: come gli altri tessuti connettivi ad origine mesenchimale è costituito da cellule e matrice extracellulare, ma si differenzia per l'elevato grado di mineralizzazione, che gli conferisce una notevole durezza e resistenza. L'associazione di tali caratteristiche con la leggerezza e l'elasticità, garantite dalla componente organica della matrice, rende questo tessuto particolarmente adatto a costruire l'impalcatura dell'organismo: lo scheletro. Le ossa sostengono il corpo, proteggono i visceri e le altre parti molli e forniscono inserzione a muscoli e tendini (Adamo S., 2005; Rosati P., 2006)

Il tessuto osseo è costituito per il 65-70% da matrice inorganica, per il 30-35% da matrice organica e circa per il 10% in peso da acqua (Kalfas IH, 2001). La sua peculiarità è quella di essere mineralizzato. La presenza di minerali, come pure l'abbondanza e la particolare distribuzione delle componenti organiche della sostanza intercellulare, conferiscono a questo tessuto spiccate proprietà meccaniche come durezza e resistenza al carico, e al tempo stesso elasticità e resistenza alla frattura.

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

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.

Il tessuto osseo, oltre alle funzioni meccaniche, partecipa all'omeostasi del calcio, di cui costituisce il principale reservoir (Berne RM, Levy MN, 2019). 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.

Generalità del tessuto osseo.

In base alla sua struttura macroscopica si distinguono due tipologie di osso: osso compatto (corticale) ed osso spugnoso (trabecolare o midollare). Queste due tipologie di osso sono costituite dagli stessi elementi cellulari e dalle stesse proteine della matrice, presentano la stessa organizzazione microscopica (organizzazione lamellare), ma sono distribuite in sedi specifiche e svolgono funzioni strutturali e metaboliche diverse.

L'osso compatto è situato perifericamente rispetto a quello spugnoso, costituisce la parte esterna dell'osso e si ritrova a formare la porzione più superficiale delle ossa brevi, delle ossa piatte e delle ossa lunghe, nonché a costituire la diafisi di queste ultime. Questo tipo di osso è caratterizzato da rigidità, è privo di cavità macroscopicamente evidenti, ed è resistente alla compressione, tensione e torsione.

L'osso spugnoso lo si ritrova principalmente a livello delle ossa brevi, delle ossa piatte e delle epifisi delle ossa lunghe. Esso ha questo nome in quanto appare conformato come una spugna, con travate ossee, dette trabecole, variamente orientate e intersecate tra loro a formare una rete tridimensionale. Nelle cavità formate dalle trabecole, dette cavità midollari, è contenuto il midollo osseo ematopoietico. Questa disposizione delle trabecole conferisce leggerezza all'osso.

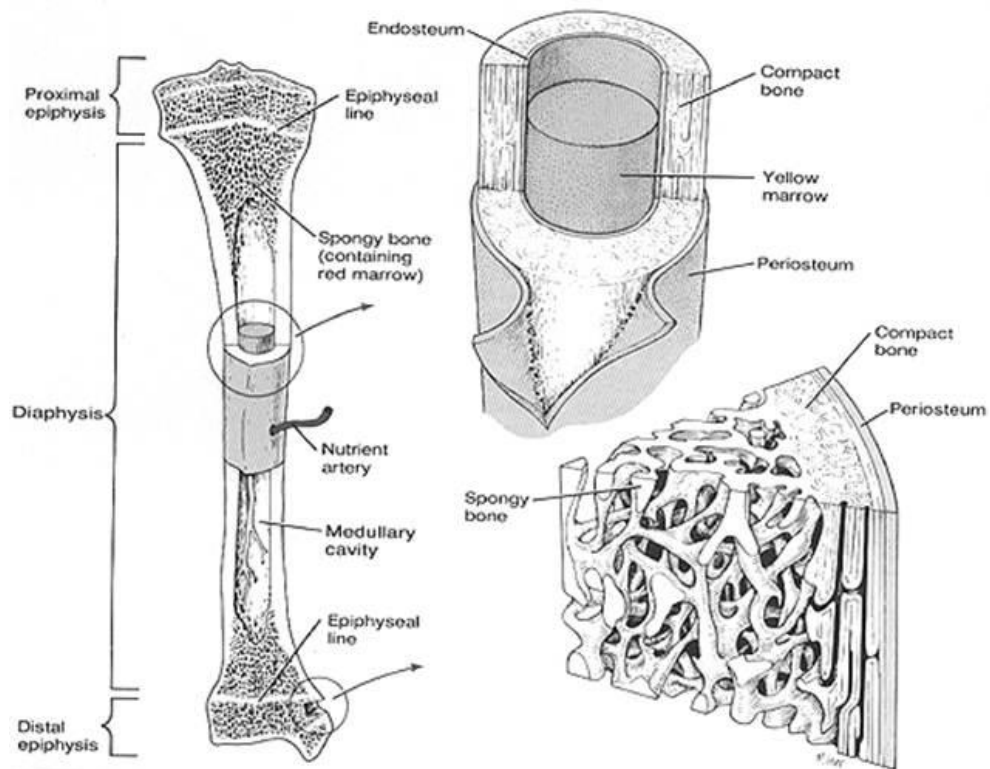


Figura 1. Descrizione macroscopica del tessuto osseo

In base alla disposizione delle fibre collagene si distinguono due varietà di tessuto osseo, quello fibroso (immaturo) e quello lamellare (maturo).

Il tessuto osseo che si forma all'inizio dello sviluppo dello scheletro fetale è denominato tessuto osseo immaturo e non presenta un'organizzazione di tipo lamellare. Quest'osso non lamellare è anche descritto come osso fascicolato o a fibre intrecciate, per l'organizzazione delle fibre collagene in fasci tra loro intrecciati. Esso contiene un numero di cellule per area unitaria maggiore rispetto all'osso maturo, e tendono a disporsi in maniera casuale. L'osso immaturo si forma più rapidamente dell'osso maturo e, sebbene questo sia senza dubbio il principale tipo di osso presente negli adulti mentre il primo rappresenta il tipo principale nel feto, aree di osso immaturo si possono riscontrare anche nell'adulto, in particolare in quelle sedi in cui il tessuto osseo va incontro a rimodellamento.

Nel tessuto osseo lamellare, invece, le fibrille collagene hanno una disposizione ed orientamento ordinato parallelo, e gli osteociti si dispongono in strati sovrapposti chiamati

lamelle ossee. In base alla disposizione di queste si distinguono due forme architetture distinte, ma entrambe rilevabili in ogni segmento scheletrico in proporzioni differenti.

Il tessuto osseo maturo è per la maggior parte costituito da unità cilindriche chiamate osteoni, detti anche sistemi di Havers, che costituiscono le unità strutturali primarie dell'osso lamellare. Essi sono costituiti da lamelle concentriche sovrapposte di matrice ossea, disposte ordinatamente intorno ad un canale centrale che contiene vasi e fibre nervose, chiamato canale di Havers. Intorno vi sono canali laterali più piccoli, chiamati canali perforanti, o di Volkmann, attraverso cui vasi sanguigni e fibre nervose provenienti dal periostio e dall'endostio raggiungono i canali osteonici. 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 e pongono in comunicazione osteociti adiacenti, formando 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).

L'osso maturo di tipo spugnoso ha una struttura simile a quella dell'osso maturo compatto, eccetto per il fatto che si organizza a formare trabecole tra le quali rimangono compresi numerosi spazi midollari. 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.

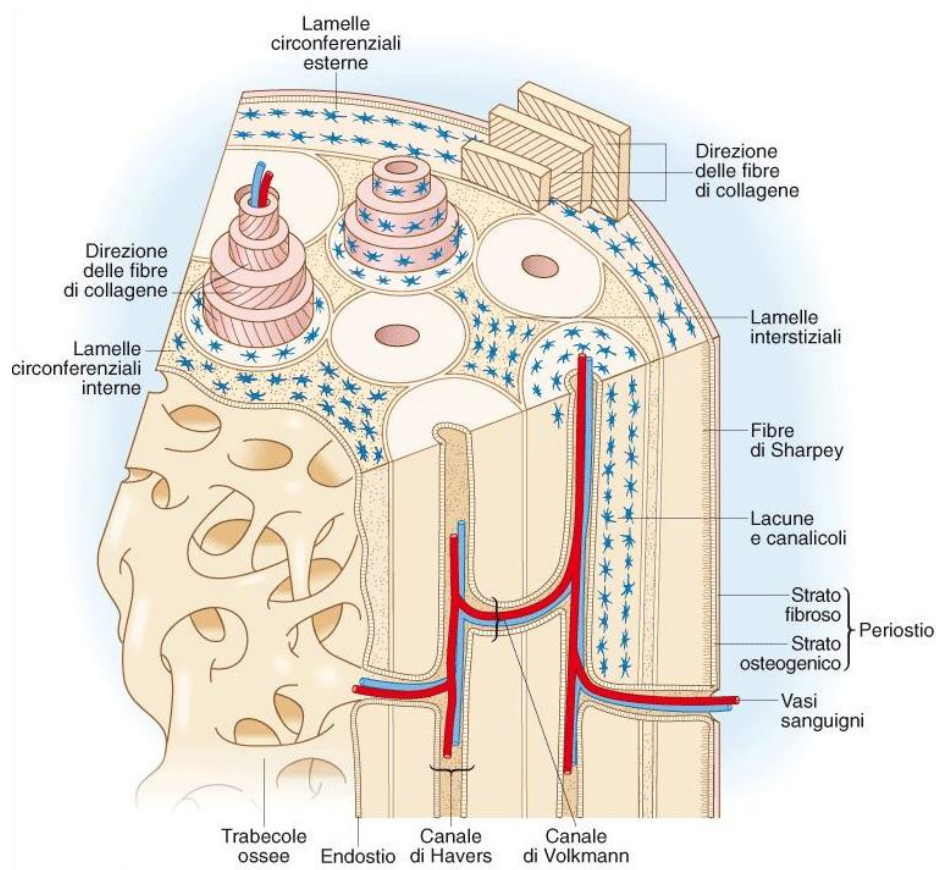


Figura 2. Schema illustrativo della microanatomia della regione diafisaria di un osso lungo

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. Esso ha il compito di proteggere l'osso e di supportare l'azione trofica mediata dai vasi sanguigni di cui è ricco. Nella faccia esterna del periostio sono presenti poche cellule e molte fibre collagene (strato fibroso). Nella faccia interna, invece, vi sono poche fibre, numerosi capillari sanguigni e cellule osteoprogenitrici con potenziale osteogenico (strato osteogenico). Dal periostio si dipartono trasversalmente, verso il tessuto osseo, fibre connettivali, dette fibre di Sharpey, che hanno il compito, addentrandosi nel sistema di lamelle circolferenziali esterne, di fornire un buon sistema di ancoraggio all'osso.

Il tessuto che riveste sia l'osso compatto prospiciente la cavità midollare sia le trabecole di osso spugnoso presenti nella stessa cavità è denominato endostio. Esso è spesso costituito da un solo strato di cellule osteoprogenitrici, con un alto potenziale osteogenico.

In ambito odontoiatrico, Lekholm & Zarb nel 1985 hanno introdotto una delle più comuni classificazioni cliniche del tipo di osso basandosi sulle differenti proporzioni relative tra componente corticale e spugnosa a livello delle ossa mascellari (Lekholm et al., 1985). Per descrivere i vari tipi di osso, gli autori si sono basati sulla valutazione radiografica preoperatoria e sulla 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).

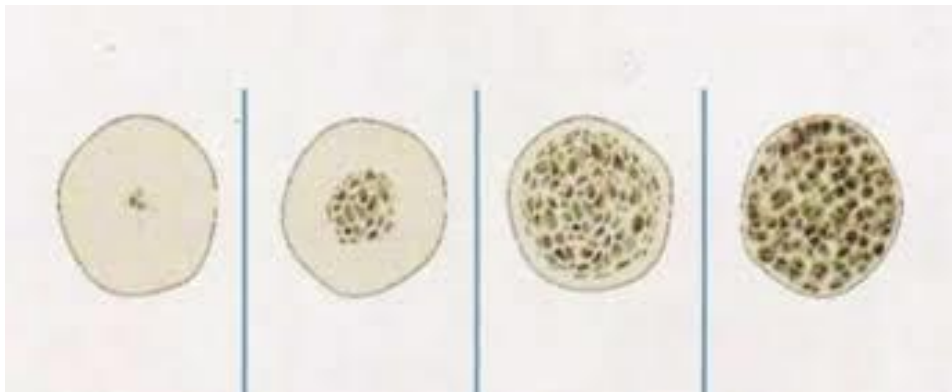


Figura 3. Classificazione di Lekholm & Zarb

Misch ha ulteriormente esteso questa classificazione a tutto il distretto cranio-facciale, basandosi sulle caratteristiche micro-strutturali delle due componenti (Misch, 1990), 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 è presente nella mandibola a livello della regione sinfisaria, nei casi di elevata atrofia ossea. Non si osserva mai nel mascellare. 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. In tale tipologia ossea sono 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, con conseguente surriscaldamento del tessuto osseo e rischio di necrosi.

L'osso 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. Si può riscontrare in regioni parzialmente edentule a livello di incisivi, canini o premolari.

L'osso di densità D3 è molto comune nel mascellare, specialmente in zona frontale, e nelle zone laterali della mandibola. 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 superiore 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.



Figura 4. *Classificazione di Misch*

Il dato clinico della densità ossea può essere rilevato con precisione per mezzo della tomografia computerizzata. I dati TC assegnano ad ogni voxel un numero che è dipendente dalla densità media dei tessuti in quello specifico volume unitario. Tale numero fa parte di una scala standardizzata delle densità espressa in Unità Hounsfield (HU) ed è possibile rapportare i dati in unità Hounsfield in base alla classificazione di Misch.

HU >1250	Misch D1
850 < HU < 1250	Misch D2
350 < HU < 850	Misch D3
150 < HU < 350	Misch D4
HU < 150	Misch D5

Tabella 1. *Rapporto tra scala Housfield e classificazione di Misch*

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.

Cellule del tessuto osseo

All'interno del tessuto osseo possiamo riscontrare diverse tipologie cellulari. 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 e 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

L'osteogenesi è il processo di formazione di nuovo osso, e perché questo si realizzi è necessaria la presenza di cellule rinnovabili, ovvero le cellule osteoprogenitrici. Le cellule osteoprogenitrici, chiamate anche preosteoblasti, derivano da cellule mesenchimali embrionali pluripotenti e possiedono le caratteristiche delle cellule staminali. Esse 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 dare origine a nuove cellule osteoprogenitrici o ad una discendenza che si differenzia in osteoblasti (Rosemberg AE, 1994). Sono molto attive in fase di accrescimento e, nell'adulto, in fase di riorganizzazione ossea o durante la riparazione di fratture.

Gli osteoblasti e la formazione ossea

Dopo il differenziamento, le cellule osteoprogenitrici diventano osteoblasti, cellule 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). Il processo di differenziazione delle cellule staminali dello stroma lungo la via osteogenica 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. Lo sviluppo degli osteoblasti è indicato dall'espressione delle sialoproteine ossee, che sono collegate con l'inizio della mineralizzazione. Gli osteoblasti sono di forma generalmente cubica, di dimensioni di circa 20 μm , con un nucleo sferico ed ovoidale. Dalla superficie matura delle cisterne dell'apparato di Golgi si staccano vescicole contenenti materiale che progressivamente condensa e assume un aspetto filamentoso (Sherft JP, Groot

CG, 1990). Tali vescicole, dette globuli calcificanti, si è visto contengano gli enzimi glicoproteici, come la fosfatasi alcalina e la pirofosfatasi, coinvolti nelle fasi iniziali della mineralizzazione ossea (Bani D., 2004).

La deposizione di matrice ossea e la sua mineralizzazione avviene secondo un ordine ben preciso: dapprima gli osteoblasti tendono a giustapporsi gli uni agli altri e a deporre 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). Gli osteoblasti producono sia il collagene di tipo I, che rappresenta il 90% delle proteine dell'osso, sia le proteine della matrice ossea (osteocalcina, osteonectina, sialoproteine e osteopontina). 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). Esso 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, o di attivarla direttamente secernendo enzimi proteolitici, tra cui la collagenasi, che rimuove lo strato di tessuto osteoide non mineralizzato che riveste la superficie dell'osso, consentendo così agli osteoclasti di aderire alla matrice mineralizzata e dissolverla. È quindi chiaro che vi è una stretta correlazione funzionale tra osteoblasti e osteoclasti. L'induzione del riassorbimento osseo da parte degli osteoclasti richiede infatti la presenza degli osteoblasti, i quali liberano gli OAF (osteoclast activating factors). Gli osteoblasti sono anche coinvolti nel differenziamento dei preosteoclasti in osteoclasti maturi (Bani D., 2004).

Gli osteoblasti rimangono murati nella sostanza intercellulare da loro deposta e si trasformano in osteociti.

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.

- L'ormone paratiroideo regola i livelli sierici di calcio stimolando il riassorbimento osseo, ma può avere effetti anabolici che sembrano essere mediati dal TGF- β e dall'Insulin-like Growth Factor-1.
- La vitamina D3, sebbene stimoli il riassorbimento osseo, è anche essenziale per la normale crescita di questo tessuto e per la sua mineralizzazione. Inoltre, stimola fortemente la sintesi di osteocalcina e osteopontina da parte degli osteoblasti mentre sopprime la produzione di collagene.
- 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.
- I glucocorticoidi sono capaci di promuovere la differenziazione degli osteoblasti e di stimolare la produzione di matrice ossea. 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. Gli ormoni tiroidei influiscono sulla ossificazione endocondrale agendo sulla formazione della cartilagine (Sodek J, McKee MD, 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, che appartengono alla famiglia del Transforming Growth Factor- β , 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, mentre stimola fortemente l'espressione di proteine della matrice nelle cellule osteoblastiche (Sodek J, McKee MD, 2000).

- Altri potenti agenti anabolici sono gli Insulin-like Growth Factors-1 e -2. I Fibroblast Growth Factors (FGF), 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 (Sodek J, McKee MD, 2000).

Gli osteociti

Quando l'osteoblasto viene ad essere completamente circondato da matrice ossea, prende il nome di osteocita. A questi si deve il ruolo fondamentale nel mantenimento dell'osso maturo e la capacità di avviarne il rimaneggiamento. Queste 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. Le cellule possono permettersi lo scambio reciproco di metaboliti anche grazie alla presenza di giunzioni comunicanti (gap junction) tra i prolungamenti di cellule vicine. Per la presenza quindi di numerosi prolungamenti citoplasmatici gli osteociti hanno forma stellata.

Gli osteociti contenuti nelle lacune possono assumere funzioni diverse secondo necessità, modificando opportunamente la propria struttura. Sono stati infatti descritti tre stati funzionali dell'osteocita: quiescente, formativo e riassorbente. 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 e il riassorbimento osseo

L'osteoclasto è la cellula deputata al riassorbimento osseo. Contrariamente a quanto si riteneva in passato, queste cellule non sono imparentate con gli osteoblasti, in quanto non appartengono alla linea che deriva dalle cellule osteoprogenitrici. I precursori degli osteoclasti, detti pre-osteoclasti, derivano dalla fusione nel sito di riassorbimento osseo di cellule progenitrici emopoietiche mononucleate (Rosemberg AE, 1994). Gli osteoclasti maturi sono cellule giganti (100-200 μm), plurinucleate: in un singolo osteoclasto possono infatti essere presenti fino a 50 nuclei (Bani D., 2004). 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 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).

Il riassorbimento della matrice ossea inizia con la dissoluzione della fase inorganica dovuta all'acidificazione del microambiente. A questo livello, l'anidrasi carbonica sita sul versante

intracellulare dell'orletto increspato, genera acido carbonico a partire da CO₂ e H₂O, e le pompe di membrana trasportano attivamente i protoni derivati dalla dissociazione dell'acido carbonico (e di altri acidi organici di origine metabolica come acido citrico e acido lattico), nell'ambiente extracellulare. L'abbassamento del pH che ne consegue porta alla dissoluzione dei cristalli di apatite. Nel contempo, l'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 (Bani D., 2004). 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., Overall CM, 1992). Al termine del riassorbimento, gli osteoclasti possono andare incontro ad apoptosi, che rappresenta un meccanismo per limitare la loro attività.

L'osteoclasta libera una moltitudine di enzimi che contribuiscono ad attivare fattori di crescita tra cui le BMP (Bone Morphogenetic Proteins) che hanno molteplici proprietà mitogeniche, chemiotattiche e di stimolo alla differenziazione (Rengachary SS, 1999). Dunque, mentre l'osso viene ridotto alle sue unità elementari, vengono rilasciate le sostanze che ne iniziano il rinnovamento (Rosemberg AE, 1994).

Regolazione dell'attività osteoclastica

La funzione osteoclastica è finemente regolata da fattori ormonali e locali. I fattori primari che stimolano 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 . La vitamina D₃ e l'ormone paratiroideo agiscono su queste cellule indirettamente attraverso i recettori dei pre-osteoblasti e degli osteoblasti. 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 SV, Roodman GD, 1998). L'interleuchina-6 è prodotta anche dagli osteoblasti, in risposta all'ormone paratiroideo e alla vitamina D₃, oltreché dagli osteoclasti stessi. Sebbene questa molecola abbia importanti effetti sul rimodellamento osseo e sia implicata nel riassorbimento del tessuto osseo associato alla carenza di estrogeni, stimola le

cellule osteoclastiche in maniera decisamente meno potente rispetto all'interleuchina-1 e al Tumor Necrosis Factor- α (Jilka R.L. et al., 1992).

Al contrario la calcitonina, il Transforming Growth Factor- β , gli estrogeni e l'interferone- γ inibiscono questo riassorbimento (Sodek J., McKee MD, 2000). Gli osteoclasti sono le uniche cellule dell'osso che possiedono i recettori per l'ormone calcitonina, prodotto dalle cellule parafollicolari (o cellule C) della tiroide (Bani D., 2004). 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. 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 . 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 (Sodek J., McKee MD, 2000).

La Matrice Ossea

Come tutti gli altri tessuti connettivi, il tessuto osseo è formato da cellule immerse in una matrice extracellulare, con la caratteristica di avere una matrice mineralizzata. Questa matrice è costituita da sostanza intercellulare organica, principalmente rappresentata da fibre collagene, e da molecole inorganiche rappresentate da fosfato di calcio sotto forma di cristalli di idrossiapatite carbonata. Inoltre, sono presenti altre proteine non collageniche, 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. (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. Sono state anche rilevate quantità molte piccole di collagene di tipo III, XI e XII, collegati 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).

Proteine non collageniche

Nonostante queste rappresentino solamente una componente minore del tessuto pari a circa il 10%, sono in realtà essenziali per lo sviluppo, la crescita e il rimodellamento dell'osso.

I gruppi principali di proteine non collageniche della matrice ossea sono i proteoglicani, l'osteocalcina, l'osteonectina, la fosfatasi alcalina e le sialoproteine ossee. 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. 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).

- I proteoglicani (PG): sono macromolecole formate da un asse proteico cui è associato un numero variabile di catene laterali di glicosaminoglicani. Quelli meglio conosciuti sono il PG di tipo I (PG-I) e di tipo II (PG-II). Queste molecole contribuiscono a rendere il tessuto osseo resistente al carico e legano fattori di crescita. (Bani D., 2004);
- L'osteocalcina rappresenta circa il 15% delle proteine non collageniche (Bronkers AL, 1994). 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 la glicoproteina più abbondante. Possiede un'alta affinità per il calcio, sia come ione libero che associato in complessi di tipo cristallino.
- 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.
- 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 sono implicati nel legame con l'HA (Ganss B., 1999). Si ritiene 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 TGF- β , 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).
- Altre proteine: nel tessuto osseo, infine, è presente una certa quota di proteine provenienti dal plasma come l'albumina, la glicoproteina HS, la transferrina ed alcune classi di immunoglobuline.

La matrice minerale

La componente minerale 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'idrossipatite, ma si possono trovare anche altri anioni (ione

carbonato nella carbonatoapatite, ione fluoruro nella fluoroapatite). 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. Osservazioni condotte durante il processo di mineralizzazione dell'osso hanno consentito di precisare che il fosfato di calcio precipita inizialmente sotto forma di minutissimi aggregati amorfi. Questi nuclei iniziali di concrezione minerale vengono rapidamente rimpiazzati da sottilissimi cristalli aghiformi, disposti parallelamente a molecole filamentose della sostanza fondamentale dette filamenti assili, di probabile natura proteica polisaccaridica. Queste sostanze hanno un ampio spettro d'azione: possono modulare la nucleazione e la successiva crescita dei cristalli in vario modo a seconda della loro dose, agendo da nucleatori a basse concentrazioni e da regolatori della crescita ad alte. Concorrono a formare un ambiente protetto intorno ai nuclei di calcificazione, stabilizzandosi e prevenendone un'ulteriore crescita, oppure possono legare ioni calcio e fosforo fungendo da attivatori, e quindi fornire una superficie per l'avvio del processo di nucleazione, in grado di conferire agli ioni la stessa configurazione spaziale dei cristalli di idrossiapatite. Possono infine legarsi a una o più facce del cristallo in crescita e bloccare l'ulteriore sviluppo, oppure associarsi ad alte proteine cambiando conformazione e proprietà d'azione sui cristalli di nucleazione, o legarsi ad altri elementi cellulari determinando variazioni nella concentrazione extracellulare di Ca/P e nel pH. In conseguenza di questa associazione, si formano pertanto aggregati minerali aghiformi disposti radialmente attorno ad un nucleo centrale, e successivamente si assiste alla calcificazione anche all'interno delle fibrille collagene. Il prevalere della calcificazione inter- o intrafibrillare sembra essere collegato alla quantità di substrato proteico disponibile: in tessuti ad elevato contenuto, come l'osso midollare, predominano le strutture aghiformi cristalline, mentre in distretti con fibrille collagene compatte, come l'osso corticale, la fase minerale è confinata all'interno delle fibrille stesse e assume un aspetto granulare amorfo. Con il procedere della calcificazione, le fibrille si aggregano lateralmente divenendo molto compatte, e questa compattazione porta ad una riposizione anche dei filamenti cristallini interfibrillari, che passano da una disposizione a noduli radiali, tipica delle prime fasi di calcificazione, ad un orientamento parallelo all'asse delle fibrille collagene. Si ritiene che la mineralizzazione della matrice avvenga in due fasi: la prima, regolata essenzialmente dagli osteoblasti che stimolano il processo di calcificazione,

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.

1.2 PRINCIPI BIOLOGICI DELLA GUARIGIONE

Un fenomeno che partecipa in modo importante ai fenomeni di riparazione di un tessuto è il processo emostatico. Esso rappresenta il primissimo meccanismo che si instaura quando vi è una lesione di un vaso e che serve sia per evitare la perdita ematica che per stimolare le cellule dell'immunità, in particolare i macrofagi, ad attivare la risposta infiammatoria che servirà a ripristinare l'integrità del tessuto. Emostasi, coagulazione e infiammazione sono sempre legati al sistema delle chinine, in modo tale da poter sinergizzare nel processo di riparazione. L'emostasi è un meccanismo di difesa finalizzato al mantenimento dell'integrità dei vasi e della fluidità del sangue. Il processo emostatico è caratterizzato da quattro fasi consecutive:

1. *Fase vascolare*: è caratterizzata da una contrazione della muscolatura liscia che ha come obiettivo istantaneo quello di cercare di ridurre il lume vascolare. Questa fase dura pochissimo e rappresenta un meccanismo di controllo nervoso da parte di una via antidromica che instaura un breve vasospasmo.
2. *Fase piastrinica*: ha l'obiettivo di creare, nel punto di lesione vascolare, un tappo che dovrà servire ad ostacolare la perdita ematica. Questo tappo, caratterizzante la fase piastrinica, viene chiamato tappo piastrinico e si instaura in seguito ad una serie di modificazioni cellulari delle piastrine che parteciperanno alla formazione di questa struttura. Affinché la piastrina possa fare il tappo piastrinico deve riconoscere il vaso lesionato, deve aderire su questo, deve modificare la propria conformazione (shape change), deve inviare un segnale ad altre piastrine tramite la degranolazione della piastrina stessa, e, le piastrine modificate, si aggregheranno poi a formare il tappo piastrinico. Tutti questi processi sono controllati da mediatori chimici dell'infiammazione, liberati dalla degranolazione piastrinica o presenti nel sito del danno poiché prodotti dalle cellule residenti (endotelio danneggiato, fibroblasti e macrofagi).

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:

- a. Proteine di adesione: fibrinogeno, fibronectina, trombospondina, fattore di Von Willebrand, modulatori della crescita connettivale e epiteliale (PDGF e TGF- β)
- b. Fattori della coagulazione: fattore 5, proteina S, PAI (inibitore dell'attivatore del plasminogeno)
- c. 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.

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 trombossano viene liberato dalle cellule 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.

3. *Fase coagulativa*: entra in gioco l'attivazione di proteasi plasmatiche che, normalmente circolanti in forma inattiva, riconoscono i messaggeri piastrinici e creano una cascata enzimatica che 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.

Cascata coagulativa

È necessario avere la 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, che è il 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. Quindi, 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 di fibrina in grado di sigillare il tappo piastrinico primario. La via comune può essere attivata attraverso due modalità differenti: con la via intrinseca, dove l'attivazione del fattore X in Xa avviene da parte di altri componenti del sangue, e con la via estrinseca, dove l'attivazione del fattore X in Xa avviene da parte di componenti al di fuori del sangue.

4. *Fase fibrinolitica*: quasi in maniera contemporanea alla coagulazione, si attiva un sistema di controllo esterno alla coagulazione che interverrà in un momento successivo e servirà per rimuovere l'eccesso del tappo piastrinico e stimolare la riparazione di un tessuto attraverso la dissoluzione di un coagulo. Questo sistema prevede l'attivazione di un sistema proteasico che è il sistema fibrinolitico.

Sistema fibrinolitico

L'obiettivo è quello di rimuovere il tappo emostatico e ciò deve avvenire in modo molto controllato perché il tappo 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 si muove verso l'interno del lume). Sposta materiale dalla parte superficiale alla parte più profonda. La durata totale del processo coagulativo e della fibrinolisi è 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 è la plasmina, che a sua volta deriva da una proteina endogena inattiva di maggiori dimensioni chiamata plasminogeno. 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.

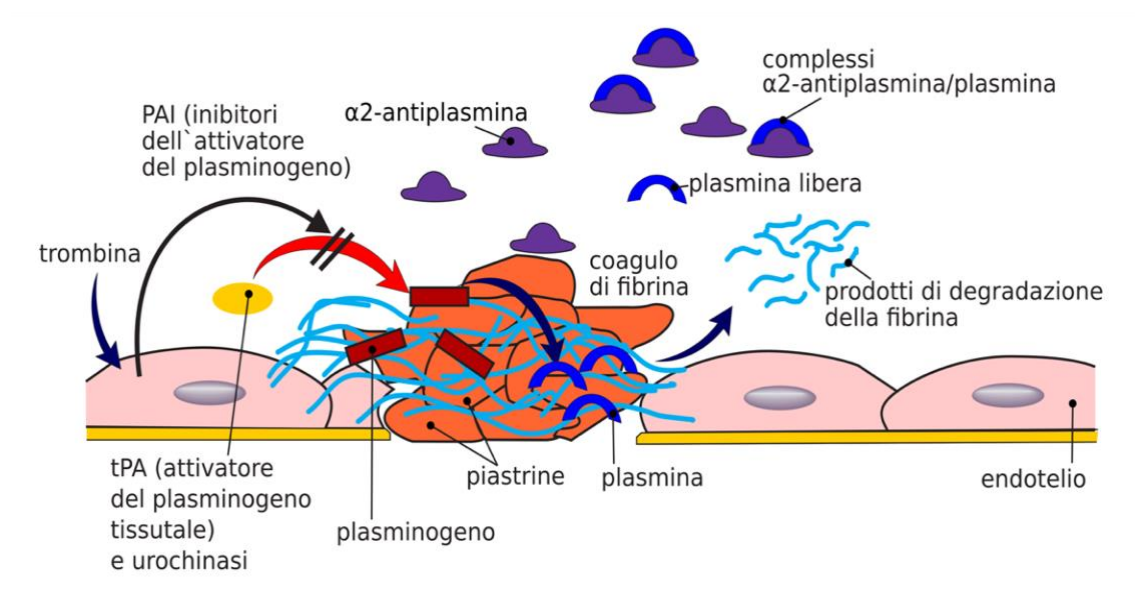


Figura 5. Sistema fibrinolitico

L'emostasi, quindi, è caratterizzata da una fase cellulare (piastrinica) e due fasi, apparentemente a funzione opposta, di natura proteasica (coagulazione propriamente detta 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 o del tessuto. 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.

1.3 RIMODELLAMENTO DELL'OSSO ALVEOLARE NELL'ALVEOLO POST-ESTRATTIVO

Alterazioni dell'osso basale e del processo alveolare in seguito a estrazione dentaria

La formazione e il costante mantenimento del processo alveolare dipendono dalla presenza continua del dente. Quest'ultimo stabilisce con il proprio apparato di attacco (cemento radicolare, legamento parodontale e osso alveolare propriamente detto) un'unità funzionale. Grazie a ciò, le forze sviluppate, ad esempio durante la masticazione, sono trasmesse dalla corona del dente, attraverso la radice e l'apparato di attacco, ai tessuti duri del processo alveolare dove verranno disperse.

La perdita di elementi dentari e il cambiamento delle condizioni all'interno o attorno all'alveolo avrà come risultato una serie di alterazioni adattative della porzione edentula della cresta alveolare. La cresta alveolare diminuisce in maniera evidente anche dopo la rimozione di un singolo dente, sia in senso orizzontale sia in senso verticale.

In uno studio condotto da Pietroskovski e Massler nel 1967 è stata analizzata l'entità di tale cambiamento di volume della cresta alveolare. Analizzando dei modelli d'impronta in cui un singolo dente era stato perduto con la controlaterale sana, si è visto che l'entità del riassorbimento di tessuto dopo la perdita di un singolo dente risultava considerevole, soprattutto con una riduzione della cresta a livello della superficie vestibolare rispetto a quella linguale/palatale in ogni campione esaminato. (Pietroskovski e Massler, 1967). Più recentemente, in uno studio clinico condotto su 46 pazienti, Schropp et al hanno studiato i cambiamenti nel tessuto molle e nell'osso che si sono verificati a 12 mesi dall'estrazione dentaria. È stato osservato che il sito edentulo, dopo 12 mesi, aveva perso oltre il 50% della sua larghezza iniziale, da 12 a 5.9 mm. (Schropp L., 2003).

Recenti review sistematiche della letteratura hanno ulteriormente studiato questi cambiamenti. Nella review sistematica di Van der Weijden del 2009, selezionando ed analizzando 12 pubblicazioni, si è visto che la riduzione media in larghezza della cresta alveolare è stata di 3.87 mm, mentre quella verticale di 1.67 mm, confermando un riassorbimento maggiore in larghezza piuttosto che in altezza (Van der Weijden F., 2009). Nello studio pubblicato da Ten Heggeler nel 2011, lasciando guarire spontaneamente l'alveolo dopo l'estrazione, si è vista una riduzione in senso orizzontale da 2.6 mm a 4.6 mm, e in senso verticale da 0.4 mm a 3.9 mm. (Ten Heggeler JMag, 2011).

Inoltre, nell'articolo di Tan del 2012 è emerso come la riduzione della dimensione orizzontale dei tessuti duri è stata maggiore di quella verticale a 6 mesi dall'estrazione. Infatti, mentre la dimensione verticale si era ridotta dall'11% al 22%, quella orizzontale dal 29% al 63%, corrispondente a circa 3.79mm. (Tan WL, 2012).

Le alterazioni dimensionali post-estrattive sembrano essere correlate a diversi fattori, tra cui il trauma chirurgico dovuto all'elevazione del lembo, alla mancanza di stimoli funzionali sulle pareti ossee residue e alla mancanza del legamento parodontale (Araújo MG, 2015).

Tale percentuale di riassorbimento può, a seconda dei casi, rendere difficoltosa la riabilitazione implanto-protetica del paziente. 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. Solo nei casi più gravi possiamo assistere ad un interessamento dell'osso basale, che comunque non sarà mai riassorbito oltre le inserzioni muscolari.

Le modalità di riassorbimento sono differenti nel mascellare e nella mandibola pur seguendo uno schema comune. 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:

- Mandibola: 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.
- Mascellare superiore: 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.

La combinazione delle due modalità induce un aspetto "vecchieggiante" al paziente e crea una condizione di pseudo terza classe. Le alterazioni che si verificano a carico della cresta alveolare in seguito ad estrazione di un singolo elemento possono essere suddivise, per ragioni didattiche, in due serie di eventi tra loro relazionati: processi intra-alveolari e processi extra-alveolari.



Figura 6: *Combinazione delle due modalità di riassorbimento*

Processi intralveolari

Secondo gli studi condotti da Amler (Amler MH, 1969) 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 neoformato 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. Il limite dello studio di Amler risiede nel fatto che è di breve durata, e valuta solo gli eventi che si verificano nella porzione marginale dell'alveolo.

Le fasi tardive di guarigione, che riguardano i processi di modellamento e rimodellamento osseo, sono state analizzate da uno studio a lungo termine condotto su animale (cani beagle) da Cardaropoli (Cardaropoli G., Araújo M., Lindhe J., 2003) Dopo aver scollato un lembo a spessore totale, sono state estratte le radici distali di premolari mandibolari. I lembi mucosi sono stati posizionati in modo da garantire un'adeguata copertura dei tessuti molli sull'alveolo post-estrattivo. La guarigione dei siti estrattivi è stata monitorata con campioni biotipici ottenuti

ad intervalli tra 1 e 6 giorni. Nel processo di guarigione possiamo individuare importanti eventi: formazione del coagulo ematico, pulizia della ferita, formazione di tessuto, con successivo modellamento e rimodellamento.

Formazione del coagulo ematico

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 alla cascata della coagulazione. Le piastrine cominciano ad aggregarsi e interagiscono con la rete di fibrina per produrre il coagulo ematico. Quest'ultimo funge da matrice fisica che guida i movimenti cellulari e contiene i fattori di crescita che influenzano le cellule mesenchimali e che promuovono l'attività delle cellule infiammatorie. Tali sostanze indurranno e amplificheranno la migrazione di vari tipi cellulari nella ferita estrattiva, così come la loro proliferazione e differenziazione nel coagulo.

Sebbene la formazione del coagulo sia cruciale per la guarigione della ferita, la sua rimozione è obbligatoria per consentire la formazione di nuovo tessuto.

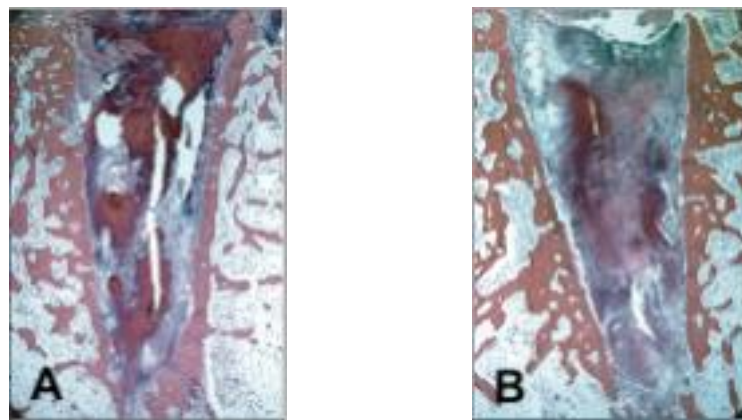


Figura 7. Sezione dell'alveolo post-estrattivo a differenti intervalli di guarigione: a 1 giorno (A), a 3 giorni (B) (Cardaropoli et al., 2003)

Fase macrofagica

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 aver compiuto il lavoro, i neutrofili vanno incontro ad un processo di morte cellulare programmata (apoptosi) e sono quindi rimossi dal sito grazie all'azione dei macrofagi.

Angiogenesi e deposizione di matrice ossea

In questa fase, penetrano nell'alveolo strutture vascolari (dai residui del legamento parodontale) e 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 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.

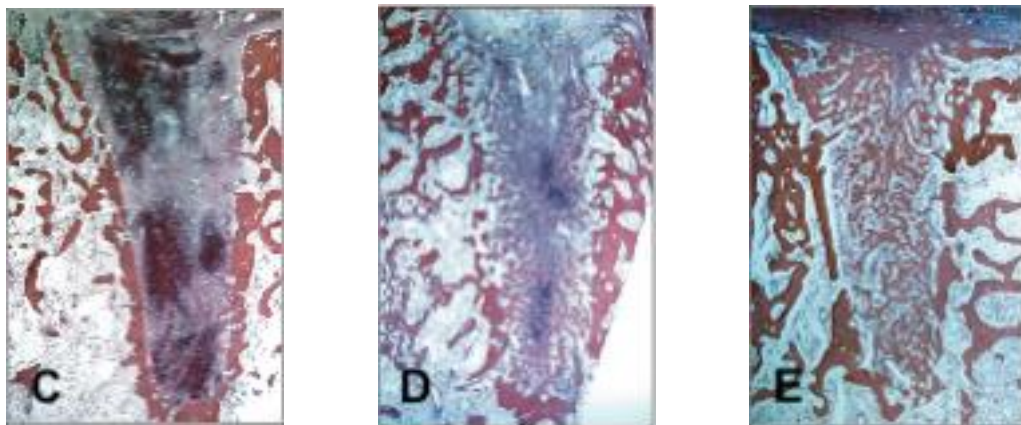


Figura 8. Sezione dell'alveolo post-estrattivo a differenti intervalli di guarigione: a 7 giorni (C), a 14 giorni (D), a 30 giorni (E) (Cardaropoli et al., 2003)

Il passaggio da connettivo a tessuto osseo avviene lungo le strutture vascolari. Le cellule osteoprogenitrici (es. i periciti) migrano e si riuniscono in prossimità dei vasi. Si differenziano in 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. 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 tal volta 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 o bundle bone) è rimosso e sostituito da osso non lamellare.

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, chiamato anche spongiosa ossea primaria. Questo 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.

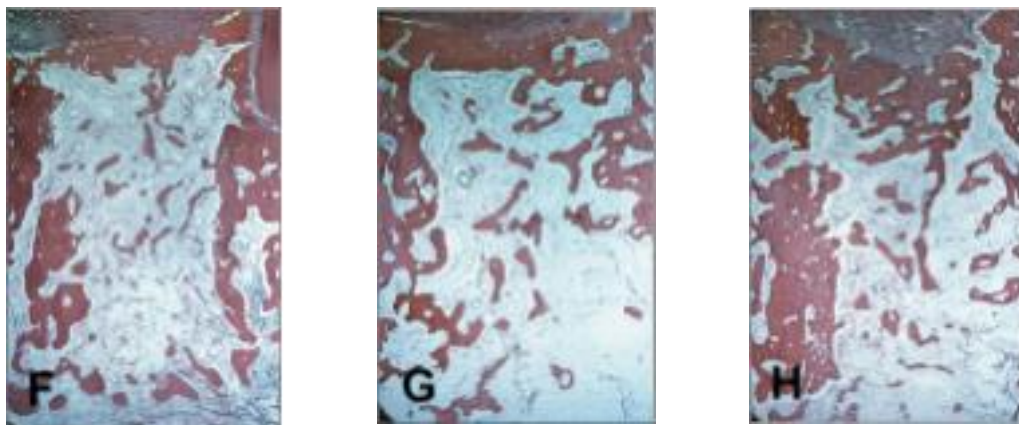


Foto 9. Sezione dell'alveolo post-estrattivo a differenti intervalli di guarigione: a 60 giorni (F), a 90 giorni (G), a 120 giorni (H) (Cardaropoli et al., 2003)

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.

Processi extralveolari

In un esperimento sui cani da Araújo & Lindhe sono state esaminate attentamente le alterazioni del profilo della cresta edentula che si verificano in seguito ad estrazione dentaria. Dopo lo scollamento di un lembo a spessore totale, le radici distali dei premolari mandibolari sono state rimosse. I lembi sono stati quindi riposizionati e suturati in modo da coprire l'alveolo estrattivo. Campioni biotipici sono stati prelevati dopo 1, 2, 4, 8 settimane di guarigione. Le sezioni seguivano il piano vestibolo-linguale.

La parete alveolare linguale risulta più ampia rispetto alla vestibolare. Uno strato di osso alveolare propriamente detto (lamina dura) occupa la porzione più interna della parete ossea linguale. Uno strato sottile di osso alveolare propriamente detto è presente anche a livello crestale. È interessante notare che nei primi 2 millimetri marginali del versante vestibolare, tutto il tessuto mineralizzato è composto da lamina dura, ed è utile ricordare anche che la lamina

dura, a questo livello, fa parte dell'apparato d'attacco del dente; questo tessuto, quindi, non svolge più alcuna funzione dopo estrazione dentaria e sarà riassorbito.

- *1 settimana dopo l'estrazione.* In questa fase l'alveolo è occupato dal coagulo. Inoltre, un cospicuo numero di osteoclasti può essere visto all'esterno e all'interno delle pareti vestibolare e linguale. La presenza di osteoclasti sulla superficie più interna delle pareti alveolari indica che la lamina dura è in corso di riassorbimento.
- *2 settimane dopo l'estrazione.* Nelle porzioni apicale e laterale dell'alveolo abbiamo la presenza di osso non lamellare di nuova formazione, mentre le parti centrale e marginale sono occupate da tessuto connettivo provvisorio. Nelle porzioni marginale ed esterna delle pareti alveolari possono essere osservati molti osteoclasti. In più parti lungo le pareti alveolari, la lamina dura è stata sostituita da osso non lamellare.
- *4 settimane dopo l'estrazione.* L'intero alveolo è occupato da osso non lamellare. Nella porzione marginale ed esterna delle pareti ossee è presente un gran numero di osteoclasti. Gli osteoclasti, inoltre, si dispongono lungo le trabecole di osso non lamellare presenti nelle zone centrale e laterale dell'alveolo. In altre parole, l'osso non lamellare di nuova formazione sta cominciando ad essere sostituito da osso più maturo.
- *8 settimane dopo l'estrazione.* Uno strato di osso corticale ricopre l'ingresso al sito estrattivo. È avvenuta la cosiddetta corticalizzazione. In questa fase, l'osso non lamellare presente alla 4° settimana è sostituito da midollo osseo e da qualche trabecola di tessuto osseo lamellare. Sul versante esterno e coronale delle pareti ossee linguale e vestibolare si notano segni di riassorbimento del tessuto duro. La lamina vestibolare è posizionata apicalmente rispetto alla controparte linguale.

Quindi, il margine della parete linguale rimane, con buona approssimazione, immutato, mentre il margine della parete vestibolare si sposta apicalmente di alcuni millimetri.

Esistono almeno due spiegazioni a tale osservazione sperimentale. Per prima cosa, prima dell'estrazione, 1-2 millimetri marginali della parete vestibolare sono occupati da osso alveolare propriamente detto (lamina dura), mentre solo una frazione minore della cresta linguale contiene lamina dura. Ora, la lamina dura, come spiegato precedentemente, è un tessuto in stretta dipendenza dal dente e, in seguito a estrazione, verrà gradualmente riassorbito. Perciò, dal momento che la regione crestale della lamina vestibolare contiene più lamina dura della controparte linguale, la perdita maggiore di tessuto duro si verificherà vestibolarmente. In secondo luogo, la parete ossea linguale è sensibilmente più ampia della vestibolare.

Sappiamo ormai da tempo (Araújo MG, Lindhe J., 2005; Wilderman MN, 1963; Wilderman MN, 1960; Wood DL, 1972; Tavitigian R., 1970) che lo scollamento di un lembo a tutto spessore e la separazione del periostio dal tessuto osseo esita in un riassorbimento superficiale. Questo poi risulterà in una riduzione maggiore della altezza verticale della sottile parete ossea vestibolare rispetto alla più ampia parete linguale. Il riassorbimento della parete ossea vestibolare è quindi più accentuato di quello della parete linguale/palatale. In casi estremi, l'intero processo alveolare può essere perduto dopo la perdita del dente, e in questa situazione rimarrà solamente l'osso basale.

La restitutio ad integrum è l'obiettivo finale della rigenerazione dell'osso alveolare danneggiato da traumi, resezioni chirurgiche o patologie infettive. Se l'integrità funzionale, tuttavia, non viene raggiunta, il processo di riparazione porterà alla formazione di tessuto fibroso che sostituirà il tessuto originario. I GFs possono migliorare la capacità dell'osso alveolare di rigenerarsi, aumentando chemiotassi, differenziazione e proliferazione cellulare. L'effetto di ciascun fattore di crescita, tuttavia, è regolato attraverso un complesso sistema di feedback, che coinvolge altri GFs, enzimi e proteine di legame (Schilephake H., 2002; Ripamonti et al. 2005). La guarigione del tessuto osseo è regolata da GFs e altre citochine con una sequenza di eventi simile alla riparazione delle ferite cutanee. Questo processo è guidato da meccanismi cellulari e molecolari controllati dalla superfamiglia di geni per il TGF- β , che codificano un grande numero di molecole extracellulari di segnale. Le proteine morfogenetiche dell'osso (BMPs) sono una famiglia molto conosciuta di GFs coinvolti nei processi di guarigione ossea; il genoma umano codifica almeno 20 di questi peptidi multifunzionali. Tra le loro molteplici funzioni, le BMPs inducono la formazione sia di osso che di cartilagine attraverso la stimolazione di eventi cellulari da parte delle cellule progenitrici mesenchimali. Solo un sottogruppo di BMPs (BMP-2, -4, -6, -7, -9) ha attività osteoinduttiva, cioè sono in grado di indurre de novo la formazione ossea. Molti altri GFs prodotti da cellule osteogeniche, piastrine e cellule infiammatorie partecipano alla guarigione ossea; tra cui IGF-I, -II, TGF- β -I, PDGF e FGF-2 (Sykaras N., Opperman L., 2003). La matrice ossea serve da riserva di questi fattori di crescita (GFs) e di proteine morfogenetiche dell'osso (BMPs) e tali molecole sono attivate durante il riassorbimento della matrice stessa ad opera di metalloproteinasi. Tali funzioni sono il risultato di complesse interazioni tra GFs e citochine guidate da molteplici fattori di regolazione.

Classificazioni delle atrofie ossee

L'elaborazione di una prima classificazione delle diverse morfologie ossee che rispecchia le varie fasi temporali del riassorbimento di queste strutture è stata fatta nel 1985 da Carl E. Misch e K. Judy. L'osso disponibile, (OD), viene classificato in base all'altezza e allo spessore/ampiezza.

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 occlusale e il rapporto corona/impianto.

Sulla base di questi parametri, gli autori identificano 4 divisioni: A, B, C, D.

- 1 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 occlusali in quel punto fino a 30 gradi, e il rapporto corona/impianto è mantenuto inferiore ad 1).
- 2 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.

- 3 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.

- 4 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.

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

Tabella 2: Classificazione di Misch-Judy ('85)

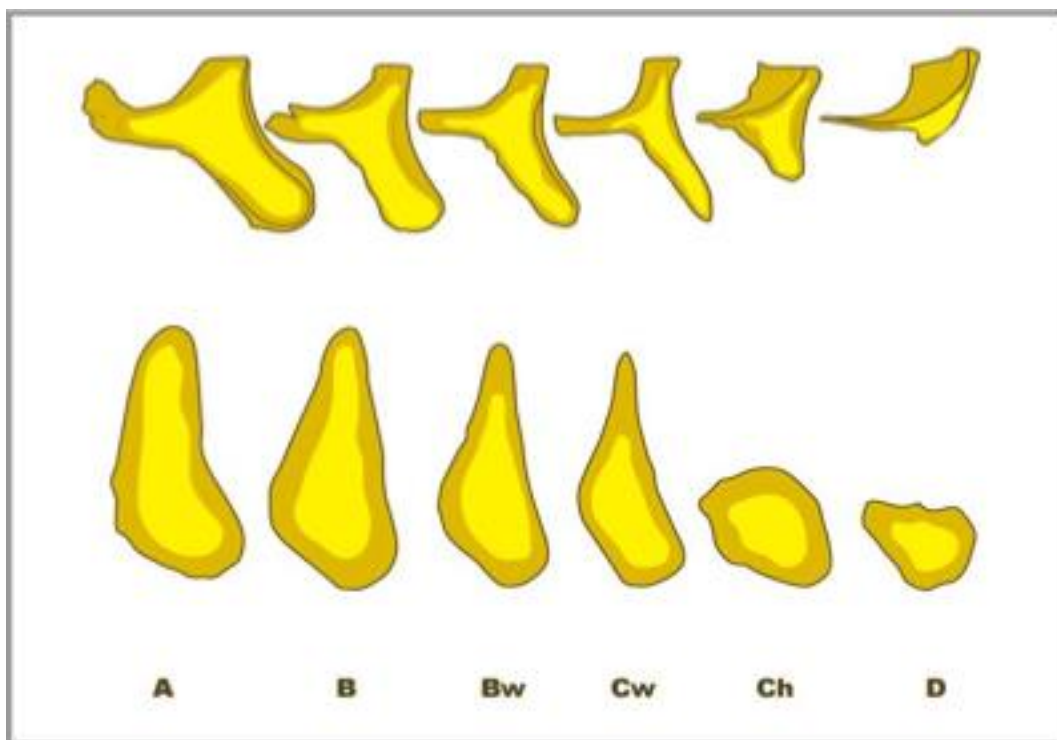


Figura 10: *Classificazione di Misch-Judy ('85)*

Nel 1988 Cawood e Howell hanno esaminato 300 crani secchi analizzando il processo di riassorbimento dei mascellari in seguito alla perdita degli elementi dentari, con l'utilizzo di punti di riferimento definiti e riproducibili. Dai loro studi questi autori hanno stilato la classificazione oggi più utilizzata.

Cawood e Howell hanno suddiviso i quadri di atrofia in 5 classi per il mascellare superiore e 6 per la mandibola:

- 1 **Classe I:** dentatura presente;
- 2 **Classe II:** cresta alveolare post estrattiva immediata;
- 3 **Classe III:** cresta alveolare post-estrattiva tardiva con ri-ossificazione dell'alveolo post-estrattivo e processo alveolare arrotondato ma adeguato in altezza e spessore;
- 4 **Classe IV:** cresta con altezza adeguata ma spessore insufficiente, definita "a lama di coltello";
- 5 **Classe V:** cresta piatta, inadeguata sia in altezza che spessore;
- 6 **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.

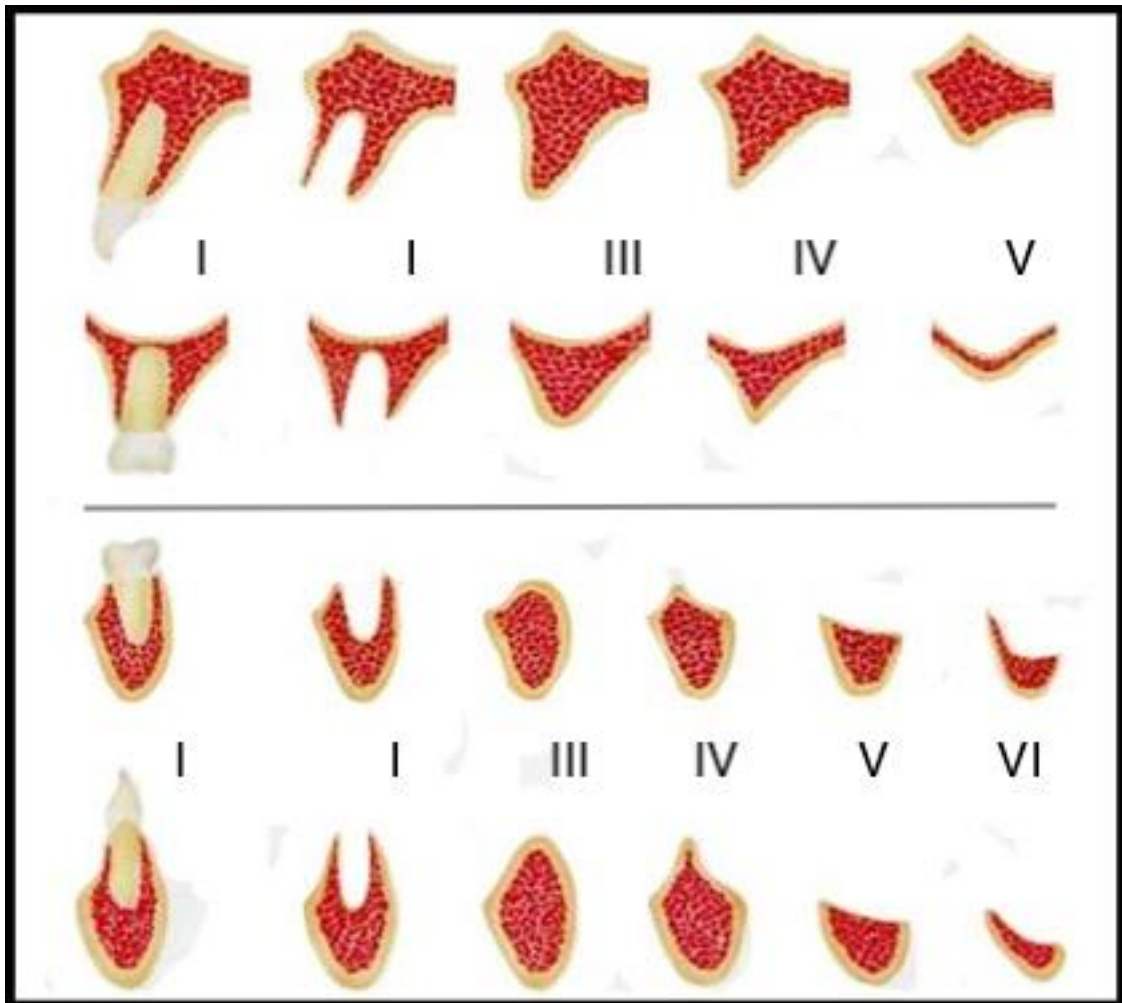


Figura 11: Classificazione di Cawood e Howell ('88)

Più recentemente, nel 2004, Chiapasco ha descritto una classificazione delle atrofie al mascellare superiore che tiene conto dell'altezza e spessore delle creste residue e della distanza inter-arcata, dando indicazioni sull'approccio chirurgico ricostruttivo da seguire.

- 1 **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.

- 2 **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.
- 3 **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.
- 4 **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.
- 5 **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.
- 6 **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.
- 7 **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.
- 8 **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.

2. PRINCIPI BIOLOGICI DELLA RIGENERAZIONE OSSEA

I principi biologici alla base della rigenerazione ossea, alla base di qualsiasi tecnica impiegata, prevedono il conseguimento la coesistenza di tre fattori essenziali:

- Cellule in grado di produrre matrice osteoide;
- Fattori di crescita in grado di stimolare le cellule osteogenetiche a proliferare e a produrre matrice osteoide;
- Uno scaffold che funga da guida del processo di rigenerazione, consentendo l'adesione, la proliferazione e la differenziazione delle cellule osteogenetiche.

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 alla 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 intra-corticale (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 le Bone Morphogenetic Proteins (BMPs).

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 rivascolarizzazione 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, 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 sua stabilità;
- Relativi al sito operato: entità del trauma chirurgico, dimensioni del difetto osseo da recuperare;
- Relativi al paziente: compliance, indice di attività metabolica dell'organismo in cui si esegue l'innesto.

2.1 BIOMATERIALI PER LA CHIRURGIA RIGENERATIVA

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, 2005; Sen MK, 2007; Jensen SS, 2009).

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 edentulia 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 miscelazione con un particolato osseo dà 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 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, quindi 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.

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.

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, sia in termini di ridge preservation che di ridge augmentation.

Lo studio condotto da Araújo nel 2009 aveva l'obiettivo di valutare l'effetto sulla formazione di tessuti duri e la quantità di aumento di cresta, in cani beagle, confrontando la guarigione di alveoli post-estrattivi innestati con Bio-Oss Collagen con quella di alveoli non innestati. Le conclusioni di questo studio portarono ad affermare che il posizionamento del biomateriale nell'alveolo post-estrattivo può contrastare la contrazione della cresta marginale, evento che si verifica fisiologicamente dopo l'estrazione del dente. (Araújo MG et al., 2009).

Più recentemente Araújo ha confermato questi risultati anche in vivo, conducendo un trial clinico randomizzato su 28 pazienti. L'innesto di Bio-Oss Collagen in alveoli post-estrattivi ha fortemente ridotto il riassorbimento osseo: in questi siti la riduzione è stata del 3%, mentre nei siti non innestati la riduzione è stata del 25%. (Araújo MG, 2015).

Lo studio di Hammerle 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. 4 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 (Hammerle M. et al., 2008)

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 biotipici 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. (Tirone F. et al., 2018).

Altri xenoinnesti di origine suina od equina sono stati altrettanto studiati. Lo studio clinico randomizzato di Festa et al (Festa VM, 2013) 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. 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 (Barone 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.

Alloplastici (sostituti ossei sintetici)

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 300micron.

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 ossidrilici. 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. In commercio è anche presente sotto forma di nano-idrossiapatite, con granuli di diametro compreso tra i 70 e i 100 nm. Studi recenti sui ratti hanno confermato la validità di tale materiale per la rigenerazione ossea, mostrando come, in confronto ad altri, a distanza di sole 8 settimane questo fosse l'unico materiale che non presentava particelle residue nel difetto. (Kubasiewicz-Ross P. et al., 2017)

- *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 (Sabattini VB, 2007). 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. 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 JM et al., 2009).

Al giorno d'oggi questo materiale trova conferme in studi che descrivono una buona e sufficiente rigenerazione in seguito al suo utilizzo. Esami istologici e micro-CT hanno mostrato come difetti nella calvaria di ratti innestati con betaTCP e solfato di calcio fossero rigenerati e in maniera migliore rispetto ad un xenoinnesto bovino o ad una guarigione spontanea (Leventis M. et al., 2018).

- *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. 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).

2.2 COLLA DI FIBRINA

I sigillanti a base di fibrina sono dei materiali non citotossici, completamente riassorbibili e matrici biologiche che simulano le ultime fasi di una 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 H., 1985; Alvinget BM 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. Perciò 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 quindi 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.

Uno studio importante, a dimostrazione che è il fibrinogeno la vera proteina ad azione osteoinduttiva è quello condotto da Le Nihouannen. Egli 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. L'assorbimento della trombina nei granuli di MBCP 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, istomorfometrici e meccanici e sono state comparate le loro proprietà. Le

analisi istologiche hanno dimostrato le proprietà osteoconduttive di questi due materiali compositi. 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. 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. (Le Nihouannen D. et al., 2007)

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 è 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 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 M., et al., 1997; Dunn CJ, Goa KL, 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; non è altro che 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.

2.3 MEMBRANE

Una membrana agisce come una barriera selettiva, impedendo fisicamente la crescita di tessuto fibroso, senza ostacolare l'apporto ematico.

Per assolvere al compito stabilito, la membrana deve avere una serie di requisiti strutturali così schematizzabili:

- deve essere costituita da materiale biocompatibile, 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;
- deve 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;
- deve avere caratteristiche di permeabilità selettiva, permettendo lo scambio di nutrienti, ma impedendo il passaggio cellulare;
- deve 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;
- deve 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.

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, 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). Questo tipo di membrane vengono riassorbite tramite idrolisi, e smaltite tramite il ciclo di Krebs in CO₂ e H₂O.

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. A questo proposito la review del 2017 di Jimenez Garcia J. ha avuto lo scopo di valutare i risultati clinici

di due diverse membrane in collagene riassorbibili (cross-linked e non cross-linked) in termini di volume di osso rigenerato, di complicanze postoperatorie e degradazione della membrana durante i processi di rigenerazione ossea. Seppur i risultati suggeriscano che non vi siano differenze significative in termini di guadagni volumetrici di osso tra i due gruppi, alcuni autori che suggeriscono risultati sottilmente maggiori con le membrane cross-linked. Per quanto riguarda le complicanze post-operatorie, invece, è stata riscontrata una tendenza maggiore all'esposizione spontanea, all'infiammazione, al gonfiore o all'infezione per le membrane cross-linked a causa dei tempi di degradazione più lunghi. In termini di biocompatibilità, integrazione tissutale e complicanze post-chirurgiche i risultati suggeriscono quindi che le membrane non-cross-linked diano risultati migliori (Jimenez Garcia J. et al., 2017).

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.

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 (2010) dimostra anche l'assenza di allergia o rigetto ed effetti collaterali noti legati a questo tipo di materiale. (Ereno C. et al., 2010)

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.

3. HORIZONTAL RIDGE AUGMENTATION: TECNICHE OPERATIVE

I risultati estetici in chirurgia implantare sono diventati negli ultimi anni sempre più importanti. Tali risultati possono essere raggiunti solo se l'impianto è posizionato tridimensionalmente, all'interno della cresta alveolare, nella posizione dettata dalla futura protesi. Ecco quindi che il concetto di "implantologia protesicamente guidata" rappresenta oggi il gold standard in chirurgia implantare. Dal momento che la posizione implantare è fondamentale per raggiungere buoni risultati estetici, appare quindi evidente come il volume di osso alveolare disponibile, e le condizioni dei tessuti molli circostanti, siano un prerequisito essenziale. Se il volume osseo non permette l'inserimento implantare corretto, dal punto di vista protesico, il clinico può scegliere la procedura di incremento osseo più appropriata a seconda del difetto presente. Nel corso degli anni sono state formulate e sperimentate diverse tecniche che avessero la finalità di ottenere un aumento orizzontale dei volumi ossei. Schematicamente possiamo distinguere 3 gruppi diverse di tecniche:

- Rigenerazione ossea guidata (GBR)
- Innesti di blocchi ossei
- Split crest e tecniche di espansione di cresta

Analizziamo ora il razionale di queste tecniche, e la loro indicazione clinica.

3.1 GBR: RIGENERAZIONE OSSEA GUIDATA

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, 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 μ m) 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 (Dahlin C. et al., 1988).

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.

In una recente revisione della letteratura condotta da Chiapasco e Casentini nel 2018 gli Autori suggeriscono indicazioni diverse a seconda che vengano usate membrane riassorbibili o membrane non riassorbibili. Le prime, infatti, vengono indicate per il trattamento di piccoli difetti peri-implantari, come deiscenze o fenestrazioni, ovvero quando è presente un moderato grado di atrofia orizzontale in cui l'inserimento implantare è contestuale alla tecnica di aumento dei tessuti duri. Inoltre, questa metodica è stata applicata anche in difetti con una grave atrofia orizzontale che non permette il contestuale inserimento implantare. In questa situazione, gli

Autori raccomandano l'uso di chips di osso autologo a coprire le spire implantari esposte, coprendoli successivamente con un sostituto osso eterologo, per creare una "over-correction" in modo da compensare il parziale riassorbimento dell'innesto. Le membrane non riassorbibili (in e-PTFE rinforzata in titanio o maglie in titanio), grazie alla loro maggior stabilità e ad un effetto barriera prolungato, invece, trovano indicazioni per correzioni di atrofie ossee più gravi, che includono anche una componente verticale di difetto. In particolare, questa tecnica è indicata quando il difetto ha una forma irregolare, che rende difficoltoso l'adattamento di blocchi ossei autologhi. In questi casi, gli Autori suggeriscono l'utilizzo di un innesto composto da chips d'osso autologo e da un biomateriale osteoconduttivo, con un posizionamento implantare ritardato fino ad anche 9 mesi.

In ogni caso, la rigenerazione con questa tecnica nei difetti ossei e nelle atrofie richiede mediamente dai 4 ai 6 mesi, 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 (Chiapasco M., Casentini P., 2018)

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

- stabilità biomeccanica del complesso di guarigione: impedisce il collasso con conseguente obliterazione dello spazio rigenerativo;
- chiusura per prima intenzione e senza tensione della ferita: consente la protezione del complesso rigenerativo e previene la deiscenza precoce con sovra infezione batterica;
- tipologia di scambio osmotico permesso dalla membrana: consente l'apporto di nutrienti necessari alla rigenerazione ossea;
- 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.

3.2 SPLIT CREST E TECNICHE DI ESPANSIONE DI CRESTA

Un'altra strategia alternativa per incrementare il volume osseo deficitario è l'applicazione dello *splitting* crestale.

Questa tecnica venne descritta per la prima volta da Agostino Scipioni nell'articolo "The Edentulous Ridge Expansion Technique: A Five-Year Study" nel 1994. In questo articolo, vennero analizzati i risultati in termini di tasso di successo implantare di 329 impianti inseriti in 170 persone effettuando l'espansione di creste atrofiche. Questa tecnica prevede l'esecuzione di un lembo a spessore parziale, incisioni intraossee crestali e verticali, e dislocazione della parete buccale in senso vestibolare, includendo una porzione della sottostante midollare. Gli impianti erano successivamente inseriti per poi seguire una guarigione di 4 o 5 mesi. In seguito alla finalizzazione protesica del caso, i risultati riportavano un tasso di successo del 98.8% a 5 anni. Per questa procedura è fondamentale che le due corticali siano ancora ben separate da una componente midollare anche minima, così da facilitare l'introduzione di strumenti per attuare l'espansione della cresta alveolare.

L'articolo presentato nel 2006 da Chiapasco si è posto l'obiettivo di descrivere la percentuale di successo delle varie procedure chirurgiche effettuate per l'incremento di cresta e il tasso di successo implantare. Da tale articolo si evince come il tasso di successo delle tecniche di espansione crestale variava dal 98% al 100%, mostrando il tasso di successo più alto rispetto alle altre tecniche, e un tasso di sopravvivenza implantare dal 91% al 97.3%. (Chiapasco M. et al., 2006)

Nel corso degli anni sono state descritte molte varianti della tecnica, che prevedevano l'utilizzo di particolari strumenti per la osteotomia e strumenti ultrasonici. In particolare, nel 2008 venne descritta la Morphogenic Bone Splitting nell'articolo "Morphogenic Bone Splitting:

Description of an Original Technique and Its Application in Esthetically Significant Areas” in cui il trattamento di tessuti duri e molli avveniva in un’unica seduta e l’inserimento implantare faceva parte del rimodellamento anatomico. Questa tecnica era indicata per le prime 4 classi secondo la classificazione di Cawood e Howell, dove è presente almeno uno spessore osseo di 10 mm in altezza e da 3 a 4 in larghezza. L’accesso all’osso era effettuato per mezzo di un lembo a spessore parziale, così da mantenere un’adeguata vascolarizzazione ossea, ma non di facile esecuzione. Tuttavia, la MBS permetteva di superare alcuni problemi della tecnica originale, associati al fatto che l’asse di rotazione era posto alla porzione apicale dell’osteotomia, provocando spesso una eccessiva inclinazione vestibolare del corpo implantare. Per questo motivo, emergevano poi problemi di natura estetica, biomeccanica, operativi e biologici. I vantaggi erano rappresentati da un unico intervento chirurgico sul complesso osteomucoso, nessun utilizzo di membrane e un profilo di emergenza implantare protesicamente corretto. (Scipioni A. et al., 2008)

Come è emerso nella systematic review del 2019 a cura di Starch-Jensen che si poneva l’obiettivo di confrontare la split crest alla tecnica di incremento volumetrico tramite innesti ossei a blocchi, la mancanza di elasticità o la presenza della linea obliqua esterna nelle regioni posteriori mandibolari rendono difficoltosa l’applicazione della tecnica di espansione di cresta, a meno che la corticale ossea sia completamente fratturata. Per questi motivi, è emerso che la tecnica di split crest è più predicibile e utile se attuata in osso mascellare anziché in mandibola a causa delle pareti corticali più sottili e dell’osso midollare più morbido, portando a guadagni di volume maggiori nel mascellare rispetto alla mandibola (Starch-Jensen T., Becktor JP, 2019). In conclusione, seppur questa tecnica possa rappresentare un’alternativa alla GBR in una limitata serie di casi, i limiti correlati a sito anatomico, eccessiva inclinazione buccale della cresta, rischio di fratture o riassorbimenti della parete ossea corticale buccale e capacità chirurgiche avanzate del clinico, rendono questa tecnica spesso poco applicata oggi giorno.

3.3 INNESTI DI BLOCCHI OSSEI

L’innesto di blocchi ossei in chirurgia ricostruttiva a scopi implantari fa ormai parte della pratica clinica da molti anni, con numerosa letteratura scientifica a supporto. I prelievi da tali

blocchi, come già descritto precedentemente, possono essere eseguiti da siti intra o da siti extra-orali, con vantaggi e complicanze annesse.

Dopo l'elevazione del lembo, si misurano le dimensioni del difetto per permettere di prelevare il blocco osseo di adeguate misure così da facilitare il modellamento dell'innesto prima della fissazione. La dimensione degli innesti, costituiti da osso corticale o cortico-midollare, può essere variabile a seconda delle esigenze. È necessario considerare che la facilità di posizionamento e la buona adattabilità sono maggiori quando la lunghezza e la larghezza dei singoli blocchi non superano 1,5 centimetri. Uno spessore corticale dell'osso innestato di almeno 3-5mm è indispensabile per ridurre i rischi di riassorbimento.

Gli innesti possono essere posizionati in 4 modi:

- Onlay orizzontale, in cui l'innesto è fissato vestibolarmente al difetto senza superare apicalmente l'osso basale
- Onlay verticale, in cui l'innesto viene fissato coronalmente al sito ricevente adattandosi all'osso basale sottostante
- Onlay a J, in modo che l'innesto abbracci sia la porzione vestibolare dell'osso basale sia quello apicale, cercando di ottenere sia un aumento orizzontale sia verticale
- Inlay, dove l'innesto deve essere interposto e fissato tra due siti riceventi creati chirurgicamente.

Al fine di colmare il gap che si crea tra il blocco osseo e il sito ricevente, si possono utilizzare dei particolati d'osso prelevati dallo stesso sito donatore con un "raschiatore", così da creare un intimo contatto tra i due siti per facilitare la migrazione di cellule osteogeniche e garantire una rapida integrazione dell'innesto. Una volta posizionato l'innesto, vengono fatte le perforazioni per le viti di fissaggio: il numero di viti utilizzate varia a seconda dell'esigenza clinica, seguendo il principio di applicarne il minor numero possibile che ne garantisca la stabilizzazione. Il graft può essere inoltre coperto da un sottile strato di sostituto d'osso a lento riassorbimento, e in fine ricoperto con membrane in collagene riassorbibili, per prevenire il potenziale riassorbimento osseo durante la guarigione. Come riportato infatti nello studio retrospettivo di Chappuis nel 2016, l'associazione di blocchi d'osso autologo protetti da DBBM e membrana in collagene ha permesso di superare un limite di questa tecnica, rappresentato dalla mancanza di mantenimento a lungo termine del volume d'osso innestato. Il tasso di riassorbimento dopo 10 anni di follow-up di siti innestati con questi materiali era basso (7.7%) portando a un mantenimento favorevole dei siti innestati.

Questa tecnica è ben documentata in letteratura, con un minor tasso di complicanze rispetto a tecnica GBR con membrane non riassorbibili. (Chappuis V. et al., 2017)

Come descritto nell'articolo di Chiapasco e Casentini nel 2018, questa tecnica trova la sua indicazione principale nel trattamento di atrofie ossee avanzate, che presentano anche una componente verticale di difetto, in edentulie singole o totali (Chiapasco M., Casentini P., 2018). Tuttavia, sono presenti anche limiti e controindicazioni nell'applicare questa tecnica. Il rischio di danneggiare strutture anatomiche rappresenta la maggior complicazione e il limite di questa procedura. Di recente innovazione è l'applicazione della chirurgia computer assistita per il prelievo di blocchi ossei in corrispondenza del ramo mandibolare. Come riportato nell' articolo del 2017 di De Stavola il prelievo di osseo autologo in sede mandibolare comporta un rischio di danno strutturale anatomico poiché il chirurgo non ha alcun controllo tridimensionale dei piani di osteotomia. In questo studio venne scelto un campione di 13 pazienti parzialmente dentati che presentavano deficit ossei nel piano orizzontali e/o verticali. La dimensione dell'innesto osseo è stata pianificata attraverso un processo di progettazione computer-assistita (CAD), definendo i piani di osteotomia ossea ideali per evitare danni alle strutture anatomiche (nervi, radici dei denti, ecc.) e per generare una guida chirurgica che imponesse la direzione di lavoro tridimensionale allo strumento per il taglio osseo.

Sono stati quindi raccolti in totale 13 blocchi ossei mandibolari per il trattamento di 16 difetti alveolari (9 verticali e 7 orizzontali). La dimensione mesiodistale media prevista del blocco osseo era di $24,8 \pm 7,3$ mm, l'altezza media era di 8 ± 1 mm e lo spessore medio era di 4 ± 2 mm. Nessuno dei pazienti trattati ha subito alterazioni neurologiche al nervo alveolare, e la guarigione è stata in tutti i casi senza complicazioni. I dati preliminari di questo studio suggeriscono che il prelievo computer assistito potrebbe rappresentare un'opportunità concreta per i clinici di ottenere un volume adeguato di osso autogeno in modo sicuro. (De Stavola L. et al., 2017)

4. PARTE SPERIMENTALE

4.1 INTRODUZIONE

Dopo l'estrazione di un dente, si verificano cambiamenti morfologici e dimensionali della cresta alveolare a causa di alterazioni qualitative e quantitative nel sito edentulo (Cardaropoli G, 2003; Araújo MG, 2005) con conseguente significativo riassorbimento e rimodellamento osseo tridimensionale (Amler MH, 1969; Pietrokovski J, Massler M, 1967; Araújo MG, 2015; Schropp L, 2003). Le alterazioni dimensionali post-estrattive sembrano essere correlate a diversi fattori, tra cui il trauma chirurgico dovuto all'elevazione del lembo, alla mancanza di stimoli funzionali sulle pareti ossee residue e alla mancanza del legamento parodontale (Araújo MG, 2015). Gli studi in letteratura hanno riportato una riduzione della dimensione orizzontale della cresta in alveoli post-estrattivi che variano da 2,6 a 4,6 mm (Van der Weijden F, 2009; Ten Heggeler JM a. 2011; Tan WL, 2012); mentre la riduzione verticale media dell'altezza della cresta è di circa 1,24 mm (Lang NP, 2012).

Sono stati studiati e testati un gran numero di biomateriali per la *ridge preservation* (Araújo MG, 2009; Cardaropoli D, 2008; Barone A, 2008), ma l'innesto di osseo autologo è ancora considerato il gold standard perché combina proprietà osteogeniche, osteoinduttive e osteoconduttive (Khan SN 2015; Sen MK 2007; Jensen SS, 2009). Tuttavia, è spesso associato a complicanze correlate al sito del prelievo e alla quantità limitata.

Studi recenti hanno dimostrato che l'innesto di alveoli post-estrattivi con xenoinnesti e l'uso di membrane barriera sono in grado di ridurre il grado di alterazioni dimensionali e di promuovere le procedure di aumento di cresta, grazie alle proprietà osteoconduttive e osteoinduttive (Araújo MG, 2015; Araújo MG, 2009; Esposito M, 2009; Avila-Ortiz G, 2014; Troeltzsch M, 2016; Milinkovic I, 2014). Sebbene il tema della "rigenerazione e conservazione di cresta" sia stato ampiamente dibattuto nella letteratura scientifica, stabilire linee guida chiare sui biomateriali e sulla tecnica da utilizzare per raggiungere risultati di trattamento predicibili rimane una sfida significativa nella pratica clinica (Avila-Ortiz G, 2014; Cardaropoli D, 2015).

4.2 OBIETTIVI

Lo scopo di questo caso clinico è stato quello di validare scientificamente una nuova tecnica chirurgica mini-invasiva chiamata "Simplified Apposition Technique" (S.A.T). Questa tecnica consiste nell'uso di osso bovino (BO, Bio-Oss, Geistlich Biomaterials, Vicenza, Italia), colla di fibrina (HFG, Tisseel, Baxter, Deerfield, Illinois, Stati Uniti) e membrana in collagene (CM, Bio-Gide compressed, Geistlich Biomaterials, Vicenza, Italia) in associazione con un alveolo post-estrattivo, al fine di ottenere un aumento della dimensione orizzontale della cresta con la formazione di nuovo tessuto duro. È stato effettuato un confronto tra la larghezza dell'osso, mediante l'uso di CBCT, prima dell'intervento chirurgico, dopo 11 mesi e dopo 2,5 anni di follow-up. Inoltre, la qualità ossea dopo 11 mesi di follow-up è stata valutata mediante analisi istologica.

4.3 MATERIALI E METODI

Per questo studio è stato scelto un paziente maschio di 69 anni. Non soffriva di malattie sistemiche e non stava assumendo farmaci che influenzano il metabolismo osseo. I criteri di esclusione sistemica sono stati: (i) esistenza di patologie ossee metaboliche, (ii) anamnesi di malignità, (iii) anamnesi di radioterapia o chemioterapia per neoplasie negli ultimi 5 anni, (iiii) anamnesi di malattia autoimmune e steroidi o terapia antibiotica a lungo termine. Al paziente sono state fornite informazioni orali e scritte riguardanti l'intervento chirurgico e lo studio, ed è stato ottenuto il consenso informato scritto.

È stato sottoposto ad una seduta di igiene orale professionale al fine di ridurre la carica batterica nel cavo orale.

Il paziente è stato trattato con una nuova tecnica non invasiva, SAT, che consiste nell'uso di BO, HFG, CM in associazione con un alveolo post-estrattivo al fine di ottenere un aumento della dimensione orizzontale della cresta con nuova formazione di tessuti duri accanto alla cresta atrofica.

4.3.1 Protocollo chirurgico

Il paziente presenta clinicamente un ponte protesico nella zona 4.5 - 4.7, senza la presenza del dente 4.6, e una cresta ossea atrofica (Figura 12A). Il dente 4.7, altamente compromesso, è stato estratto. Un'ora prima dell'intervento chirurgico, il paziente ha ricevuto 2 gr di amoxicillina e, appena prima dell'intervento, è stato eseguito un risciacquo con collutorio allo 0,2% di clorexidina per 2 minuti. Inoltre, è stato prescritto 1 g di amoxicillina due volte al giorno per 5 giorni.

Il paziente è stato sottoposto ad anestesia locale con Articaina, 40 mg/ml 1: 100.000, somministrato vicino al nervo e Articaina, 40 mg/ml 1: 1.200,00, somministrato per infiltrazione nelle aree adiacenti l'intervento. Il dente 4.7 è stato estratto con cura con una pinza nel tentativo di minimizzare il trauma all'osso circostante. L'alveolo del dente è stato accuratamente curettato per rimuovere il tessuto di granulazione. Si è prestata particolare attenzione a evitare danni ai tessuti molli. L'estrazione è stata eseguita usando una procedura *flapless* (Figura 12B). Dopo l'estrazione, è stato sollevato un lembo mucoperiostale, usando una lama 15C, facendo un'incisione crestale nella mandibolare edentula. L'incisione crestale è stata continuata con un'incisione sulcure sui denti adiacenti. Sono stati scollati lembi a tutto spessore nei versanti buccale e palatale per massimizzare la visualizzazione del difetto e per consentire un buon posizionamento del materiale d'innesto (Figura 12C). Secondo la S.A.T., la ricostruzione della cresta e il riempimento dell'alveolo sono stati eseguiti utilizzando BO, HFG e CM (Figura 12D). L'HFG è stata usata dopo aver diluito la trombina con soluzione fisiologica da 500 UI a circa 5 UI. Quindi, utilizzando il dispositivo fornito dal produttore, la trombina diluita è stata miscelata con il fibrinogeno umano, al fine di ottenere più tempo di lavoro e ridurre la polimerizzazione precoce della colla. BO è stato bagnato con qualche goccia di soluzione fisiologica e con HFG diluito ottenuto un materiale compatto. Il materiale ottenuto è stato posizionato nell'alveolo e sulla cresta per l'incremento orizzontale. Successivamente, una membrana di collagene è stata tagliata e bagnata con qualche goccia di HFG, ed è stata delicatamente posizionata sopra l'innesto (Figura 12E). Infine, per fissare la membrana e il materiale da innesto in posizione sono state eseguite suture a materassai modificato e suture singole, utilizzando suture 5-0 PTFE non assorbibili (Omnia S.r.l., Parma, Italia). Sono state messe alcune gocce di HFG sopra le suture per aumentare la protezione e la rapidità della guarigione dei tessuti molli (Figura 12F). Le suture sono state rimosse dopo 10 giorni. Nel sito post-estrattivo c'è stata una guarigione per seconda intenzione; mentre nel sito di aumento

orizzontale di cresta c'è stata una guarigione per prima intenzione. Al paziente è stato chiesto di continuare i risciacqui di clorexidina per 5 giorni, ed è stato monitorato settimanalmente durante il primo mese di guarigione.

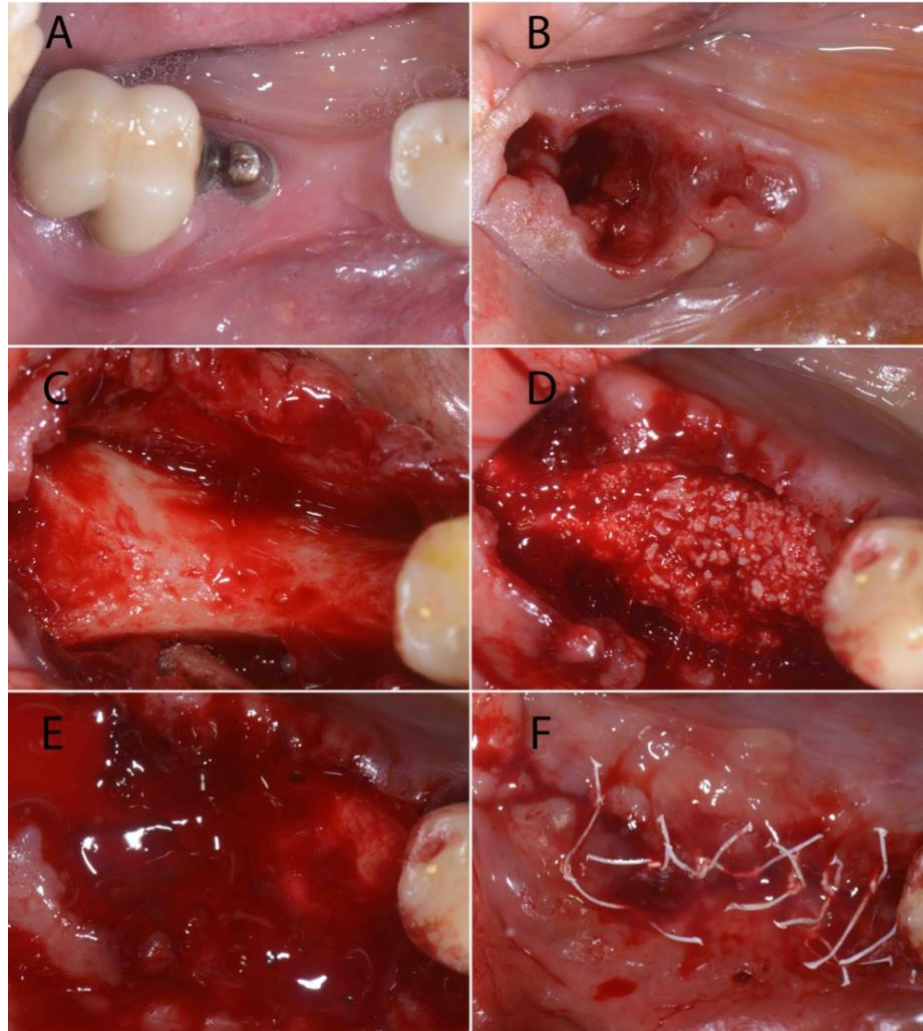


Figura 12. (A) Sito mandibolare nel giorno dell'estrazione. L'elemento 4.7 è stato estratto usando una procedura flapless (B). Dopo l'estrazione, (C) è stato sollevato un lembo mucoperiostale ed è stata esposta la cresta ossea. Secondo la S.A.T, la ricostruzione della cresta e il riempimento dell'alveolo sono stati eseguiti con Bio-Oss (D), colla di fibrina umana e membrana di collagene (E). Per fissare la membrana e il materiale da innesto sono stati usati punti a materassi orizzontale modificato e punti singoli, coperti da alcune gocce di HFG (F).

4.3.2 Valutazione radiografica: CBCT

Prima di iniziare la fase chirurgica, il paziente è stato sottoposto a un controllo radiografico tramite Cone Beam CT (CBCT, Carestream 8100 3D), in modo da valutare la larghezza ossea del sito analizzato. L'esame radiografico è stato ripetuto dopo 11 mesi di guarigione e dopo 2,5 anni di follow-up. Le immagini sono state acquisite tramite il software Carestream ed elaborate al computer. L'acquisizione è stata eseguita secondo il protocollo di acquisizione con un voxel di piccole dimensioni. L'osso corticale buccale e linguale sono stati presi come punti di riferimento. La larghezza della cresta ossea è stata determinata misurando in direzione perpendicolare la distanza tra le pareti vestibolari e linguali. Un secondo operatore, non a conoscenza del protocollo, ha eseguito le misurazioni.

Inoltre, dopo 11 mesi, dopo anestesia locale, è stato sollevato un lembo e l'innesto appariva ben integrato e compatto. È stato inserito un impianto in zona 4.6 (4,1 mm. X 11,5 mm., T3 Biomet 3i), completamente nella cresta ossea. Allo stesso tempo, i frammenti ossei rimasti nelle frese sono stati conservati e utilizzati per la valutazione istologica.

4.3.3 Valutazione istologica

Il campione è stato immediatamente fissato in formalina tamponata al 10% per 24 ore e decalcificato usando acido etilendiamminotetraacetico al 4,13% (EDTA) (Sigma-Aldrich, Milano, Italia). L'analisi immunoistochimica è stata eseguita su sezioni istologiche integrate in paraffina (Orsini G, 2007). 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 (Figura 15). È stato osservato nella normale luce trasmessa sotto è stato valutato al microscopio ottico Nikon Eclipse E600.

5 RISULTATI

Per questo studio è stato scelto un paziente maschio di 69 anni. Le procedure chirurgiche sono state eseguite con successo senza complicazioni. La valutazione di follow-up eseguita al momento della rimozione della sutura, al giorno 10, e dopo 1 mese, ha mostrato una guarigione per seconda intenzione senza complicanze, nessun segno di infiammazione e chiusura dei tessuti molli, che è stata in parte ottenuta appunto mediante una guarigione per seconda intenzione, usando l'associazione di membrana in collagene e colla di fibrina umana (Figura 13A, 13B). L'HFG consente di creare un sigillo che stabilizza il coagulo e facilita la guarigione dei tessuti (Le Nihouannen D, 2007). L'analisi CBCT, eseguita a 11 mesi di follow-up, ha rivelato una buona integrazione del materiale da innesto e nessuna radiotrasparenza residua. Al baseline, la larghezza della cresta, tra le pareti vestibolari e linguali, era di 3,7 mm. Dopo 11 mesi, la larghezza analizzata è aumentata notevolmente, raggiungendo i 6,5 mm (Figura 14A, 14B). La CBCT effettuata dopo 2,5 anni di follow-up ha mostrato un mantenimento dei volumi ricostruiti (Figura 14C).

Dopo l'elevazione del lembo, dopo 11 mesi, nella zona di estrazione il materiale innestato sembrava avere una consistenza compatta e nel sito non si osservavano particelle di innesto fibrointegrate.

Alla valutazione al microscopio ottico, i frammenti ossei hanno mostrato varie fasi di maturazione e formazione ossea, mostrando una buona qualità dell'osso lamellare compatto senza alcuna risposta infiammatoria. L'area rigenerata con BO e HFG ha mostrato osso di nuova formazione e un'ottima integrazione con l'osso preesistente. Erano presenti resti di particelle residue e innesti di biomateriale amorfi a contatto con l'osso appena formato. Il tessuto osseo lamellare compatto presentava numerosi osteoblasti e numerose lacune di osteociti; le aree ossee native erano caratterizzate da strutture osteoniche ben distinte, a dimostrazione di un elevato grado di caratteristiche di un osso maturo (Figura 15).

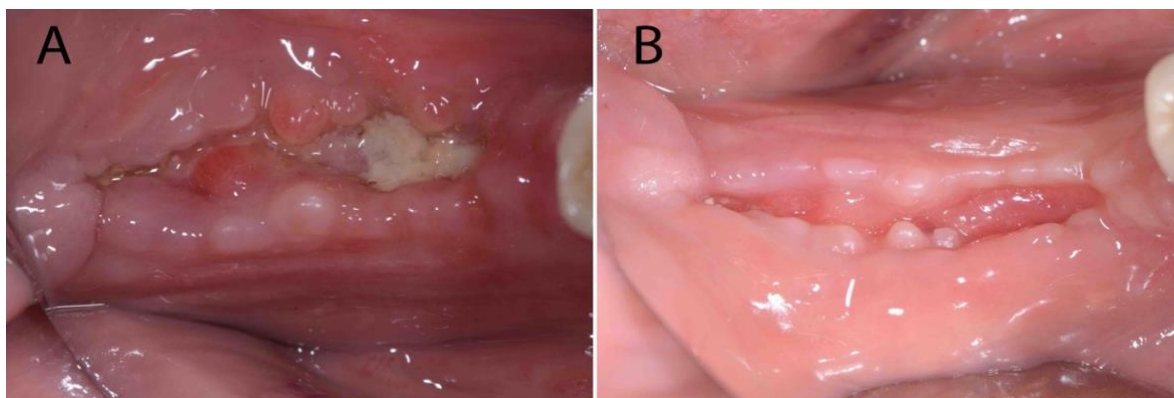


Figura 13: (A) Aspetto clinico del sito innestato dopo 10 giorni di guarigione, al momento della rimozione della sutura. (B) Aspetto clinico del sito innestato dopo 1 mese di guarigione. La chiusura dei tessuti molli è avvenuta in parte con una guarigione per seconda intenzione, senza segni di infiammazione.

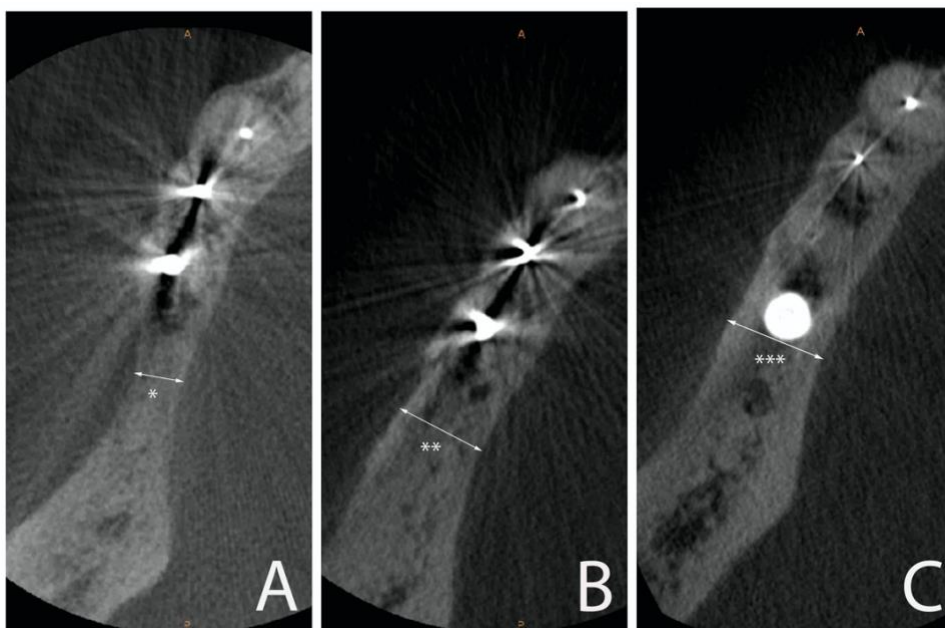


Figura 14: CBCT effettuata immediatamente dopo l'estrazione dell'elemento 4.7 (A) e dopo 11 mesi di guarigione, dopo l'esecuzione della S.A.T (B). Non è stata notata alcuna radiotrasparenza residua, ed il materiale di innesto si è ben integrato. L'aumento della larghezza dell'osso era evidente, confrontando la larghezza in A (*) con quella in B (**). La CBCT effettuata dopo 2,5 anni di follow-up ha mostrato un mantenimento dei volumi

orizzontali ricostruiti (***), rispetto a B (C). Il pois radiopaco in C è l'impianto inserito completamente nella cresta ossea, impossibile prima della ricostruzione tramite S.A.T.

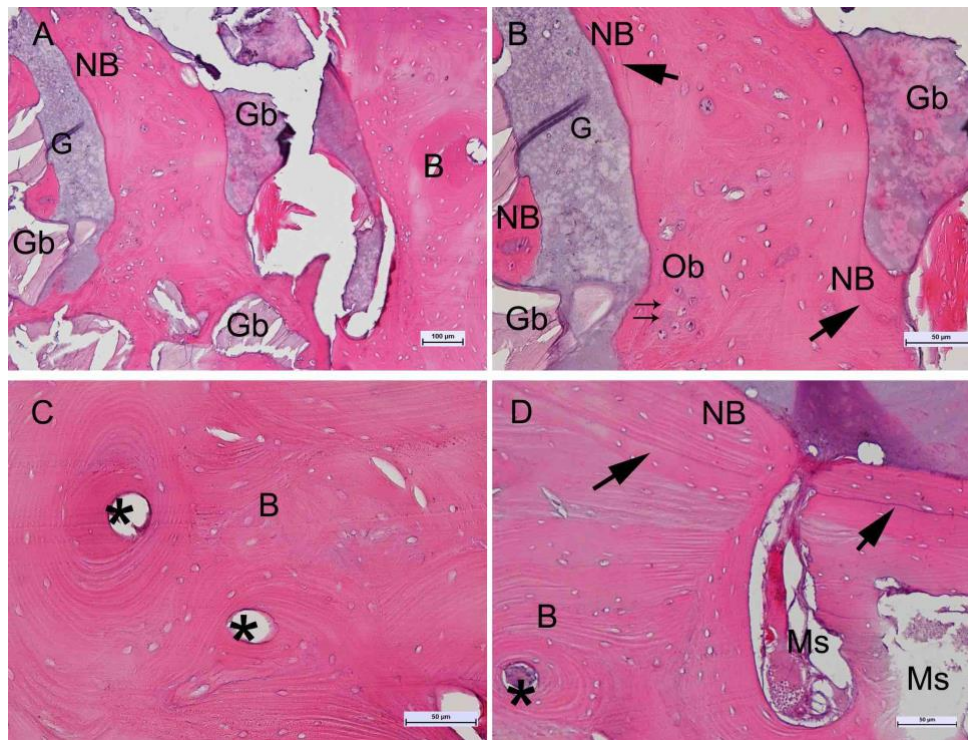


Figura 15: Immagini al microscopio ottico ad alto ingrandimento dell'area rigenerata. (A) Numerose particelle residue e strutture amorfe dei biomateriali innestati (Gb e G) sono a stretto contatto con l'osso appena formato, che è colorato intensamente da ematossilina ed eosina (NB), è trabecolare in alcune regioni, specialmente vicino agli innesti, e sta già acquisendo caratteristiche di osso lamellare maturo nella maggior parte delle regioni (NB in B, C, D). Sono presenti alcune linee di cemento che segnano il passaggio tra osso di nuova formazione (NB) e osso preesistente (B) (freccie). Il tessuto osseo lamellare compatto presenta diversi osteoblasti (Ob indicati da piccole frecce) e numerose lacune osteocitiche; le aree ossee native (B) sono caratterizzate da strutture osteoniche ben distinte (*), a dimostrazione di un elevato grado di caratteristiche ossee mature. Sono presenti alcuni spazi midollari (Ms). Ingrandimento originale di A: 10x; di B, C e D: 20x

6 DISCUSSIONE

Spesso al di sotto del ponte protesico si riscontrano difetti ossei orizzontali. Quando è necessario estrarre il moncone protesico perché ritenuto senza speranza, i clinici devono essere in grado di trovare una soluzione protesica in merito alla cresta ossea atrofica residua vicino all'alveolo post-estrattivo. I materiali da innesto osseo sono notevolmente migliorati negli ultimi anni, aumentando l'applicabilità e il successo dell'implantologia orale e delle procedure di aumento di cresta ossea.

BO è uno xenoinnesto di origine bovina dotato di elevate proprietà osteoconduttive. Lindhe et al. (2014) hanno condotto uno studio sull'uomo e hanno riportato che il tessuto dell'alveolo che era stato innestato con Bio-Oss Collagen dopo 6 mesi di guarigione conteneva particelle di innesto circondate da una matrice provvisoria riccamente vascolarizzata e tessuto osseo di nuova formazione (Lindhe J, 2014).

Uno studio precedente mostra risultati in accordo con la letteratura scientifica: dopo 6 mesi, BO non mostra segni di riassorbimento ed è ben integrato nei tessuti ospiti; inoltre, l'osso di nuova formazione presenta caratteristiche simili al tessuto osseo preesistente, indicando così le buone proprietà osteoconduttive del Bio-Oss (Orsini G, 2007). Al fine di aumentare le proprietà osteoconduttive di BO, in questo studio è stato associato con HFG in un alveolo post-estrattivo. L'HFG viene utilizzata in chirurgia grazie alle sue proprietà emostatiche, chemiotattiche e mitogeniche, e anche come *scaffold* per la crescita cellulare. Nel contesto della rigenerazione ossea, l'associazione di BO ad un agente legante come HFG può produrre un materiale di facile manipolazione senza la formazione di spazi vuoti, che potrebbe aumentare le proprietà osteoconduttive e osteoinduttive, associate ai fattori di guarigione (Le Nihouannen D, 2007). Inoltre, questi biomateriali sono stati coperti da una membrana di collagene, al fine di evitare la colonizzazione delle cellule epiteliali e ricreare lo spazio per il coagulo. Si consiglia l'uso di una membrana barriera per stabilizzare e proteggere il volume aumentato (Park S-H, 2008).

Sulla base dei dati disponibili dalla letteratura scientifica, è stata proposta questa nuova tecnica chirurgica. S.A.T. consente di ottenere un aumento della dimensione orizzontale della cresta ossea atrofica con la formazione di nuovi tessuti duri, sfruttando le proprietà osteoinduttive e osteoconduttive dei biomateriali (BO, HFG e CM), rese migliori dalla presenza di fattori di guarigione derivanti dall'alveolo post-estrattivo.

Questo protocollo semplifica la tecnica chirurgica, ottenendo buoni risultati, poiché:

- Non viene eseguito alcuna incisione di svincolo verticale;
- La rigenerazione dell'alveolo post-estrattivo e l'aumento orizzontale della cresta atrofica vengono eseguiti contemporaneamente;
- L'associazione di BO, HFG, CM con un alveolo post-estrattivo, che rilascia fattori di crescita, aumenta le proprietà rigenerative di questi biomateriali;
- HFG e CM consentono di mantenere BO in posizione, senza dover utilizzare viti o pins;
- HFG, associata a BO, consente di avere sia proprietà osteoinduttive sia osteoconduttive nel sito innestato;
- Nel sito post-estrattivo, questa tecnica consente di avere una guarigione per seconda intenzione che non compromette i risultati clinici del materiale innestato, grazie all'associazione di CM e HFG, che stabilizzano e proteggono il sito rigenerato;

Secondo i risultati ottenuti, si è potuto vedere la formazione di osso compatto lamellare all'esterno dell'osso corticale preesistente. Al fine di ottenere nuovo osso ben integrato con l'osso preesistente sembra che non sia necessario effettuare delle perforazioni corticali. Inoltre, quando è presente un osso sottile, la perforazione corticale potrebbe creare una sofferenza dell'osso, con un risultato peggiore della rigenerazione (Greenstein G, 2009). L'uso di HFG è di fondamentale importanza in questa tecnica. Ciò potrebbe essere dovuto (i) ai fattori di crescita presenti nell'HFG, la cui azione è potenziata dai fattori di guarigione derivati dall'alveolo post-estrattivo, e (ii) alla sua prolungata fissazione nella ferita chirurgica che protegge e stabilizza il sito rigenerato, in associazione con CM (Palachur D, 2014). Il protocollo proposto in questo studio ha permesso di ottenere, per quanto riguarda l'aumento orizzontale di cresta, risultati simili alla media presenti in letteratura scientifica (Jensen SS, 2009; Troeltzsch M, 2016).

7 CONCLUSIONI

L'obiettivo della S.A.T è di ricreare e mantenere una larghezza della cresta ossea favorevole al posizionamento futuro dell'impianto, usando BO, HFG e CM, in associazione con i fattori di guarigione che si trovano nell'alveolo post-estrattivo. Pertanto, S.A.T consente di semplificare la tecnica chirurgica di aumento orizzontale di cresta, ottenendo buoni risultati in un solo intervento chirurgico e con meno disagio per il paziente.

La rilevanza clinica consiste nella sua applicazione in pazienti che presentano creste ossee atrofiche. Le buone caratteristiche cliniche, radiografiche e istologiche dell'osso a 11 mesi suggeriscono che questa tecnica potrebbe essere utilizzata con grandi risultati. Sono stati raccolti ulteriori casi clinici al fine di preparare una serie di casi che dimostrino l'affidabilità del S.A.T., e il confronto di questa procedura con altre tecniche chirurgiche. Nonostante il limite di questo studio legato ad un solo caso clinico, i promettenti risultati istologici e chirurgici forniscono prove valide che la S.A.T. potrebbe essere considerata un metodo di rigenerazione ossea efficace, minimizzando così i rischi di morbidità postoperatoria, aumentando stabilmente il volume osseo orizzontale nel tempo, come dimostrato dalla CBCT a 2,5 anni di follow-up.

Sebbene l'osso autogeno sia ancora oggi considerato il gold standard per le procedure di innesto, grazie alle sue proprietà osteogenetiche (Jensen SS, 2009; Simion M, 2001; Nyström E, 2009), presenta alcuni ovvi svantaggi (Troeltzsch M, 2016) che possono essere superati dalla ricerca di sostituti ossei alternativi, anche di origini diverse, così come da tecniche chirurgiche semplici e mini-invasive.

S.A.T. è una procedura innovativa che può sfruttare una corretta osteoinduzione, derivante dall'alveolo post-estrattivo (Pagni G, 2012), associata alle proprietà sopra descritte di BO, HFG e CM. In virtù della letteratura scientifica e dei risultati offerti da questa tecnica, è consigliabile usare un biomateriale arricchito con collagene, come ad esempio Bio-oss Collagen (costituito per il 10% da collagene di origine suina) o il Gen-Os (osso cortico-spongioso collagenato di origine suina). Ulteriori studi sono in corso, al fine di supportare l'uso combinato di questa tecnica con diversi biomateriali, sempre in associazione con i fattori rilasciati dall'alveolo post-estrattivo.

8 BIBLIOGRAFIA

Adamo S, Carinci S, Istologia di Monesi V., Piccin, Padova 2005;

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

Araújo MG, Lindhe J. *Dimensional ridge alterations following tooth extraction. An experimental study in the dog*. J Clin Periodontol 32 (2005): 212–218.

Araújo MG, Lindhe J. *Ridge preservation with the use of Bio-Oss collagen: A 6-month study in the dog*. Clin Oral Implants Res 20 (2009): 433–440.

Araújo MG, da Silva JCC, de Mendonça AF, et al. *Ridge alterations following grafting of fresh extraction sockets in man. A randomized clinical trial*. Clin Oral Implants Res 26 (2015): 407–412

Araújo MG, Silva CO, Misawa M, et al. *Alveolar socket healing: what can we learn?* Periodontol 2000 68 (2015): 122–134.

Aubin JE, Gupta AK, Zirngibl R, Rossant J. *Knockout mice lacking bone sialoprotein expression have bone abnormalities*. J Bone Miner Res 1996; (11): S102

Avila-Ortiz G, Elangovan S, Kramer KWO, et al. *Effect of alveolar ridge preservation after tooth extraction: a systematic review and meta-analysis*. J Dent Res 93 (2014): 950–958.

Bani D. *Istologia mana. Il tessuto osseo*. Idelson-Gnocchi 2004

- Barone A, Aldini NN, Fini M, Giardino R, Calvo Guirado JL, Covani U. *Xenograft versus extraction alone for ridge preservation after tooth removal: a clinical and histomorphometric study*. J Periodontol 2008 Aug;79(8):1370-7.
- Berne RM, Levy MN, Fisiologia, Casa Editrice Ambrosiana, Milano, 2019
- Buckwalter JA, Glimcher MJ, Cooper RR and Recker R. *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.
- Cardaropoli G, Araújo M, Lindhe J. *Dynamics of bone tissue formation in tooth extraction sites. An experimental study in dogs*. J Clin Periodontol 30 2003: 809–818
- Cardaropoli D, Cardaropoli G. *Preservation of the postextraction alveolar ridge: a clinical and histologic study*. Int J Periodontics Restorative Dent 28 (2008): 469–477.
- Cardaropoli D, Tamagnone L, Roffredo A, et al. *Evaluation of Dental Implants Placed in Preserved and Nonpreserved Postextraction Ridges: A 12-Month Postloading Study*. Int J Periodontics Restorative Dent 35 (2015): 677–685.
- Chappuis V, Cavusoglu Y, Buser D, von Arx T. *Lateral Ridge Augmentation Using Autogenous Block Grafts and Guided Bone Regeneration: A 10-Year Prospective Case Series Study*. Clin Implant Dent Relat Res. 2017 Feb;19(1):85-96
- Cawood JJ, Howell RA. *A classification of the edentulous jaws*. Int J. of Oral and Maxillofacial Surgery 1988;17:223-236
- Chiapasco M. *Manuale illustrato di chirurgia orale*. Masson 2002

- Chiapasco M, Casentini P. *Horizontal bone-augmentation procedures in implant dentistry: prosthetically guided regeneration*. Periodontol 2000. 2018 Jun;77(1):213-240.
- Chiapasco M, Zaniboni M, Boisco M. *Augmentation procedures for the rehabilitation of deficient edentulous ridges with oral implants*. Clin Oral Implants Res. 2006 Oct;17 Suppl 2:136-59
- Dahlin C, Linde A, Gottlow J, Nyman S. *Healing of bone defects by guided tissue regeneration*. Plast Reconstr Surg. 1988 May;81(5):672-6.
- 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 Int 1993; 49. 349-354
- De Stavola L, Fincato A, Bressan E, Gobbato L. *Results of Computer-Guided Bone Block Harvesting from the Mandible: A Case Series*. Int J Periodontics Restorative Dent. Jan/Feb 2017;37(1):e111-e119.
- 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
- 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.

- Esposito M, Grusovin MG, Felice P, et al. *The efficacy of horizontal and vertical bone augmentation procedures for dental implants - a Cochrane systematic review*. Eur J Oral Implantol 2 (2009): 167–184.
- 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.
- Ganss B, Kim RH, Sodek J. *Bone sialoprotein*. Crit Rev Oral Biol Med. 1999; 10(1):79-98.
Review
- Greenstein G, Greenstein B, Cavallaro J, et al. *The role of bone decortication in enhancing the results of guided bone regeneration: a literature review*. J Periodontol 80 (2009): 175–189.
- 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
- II International Consensus Conference on Biomaterials, Chester, Inghilterra 1991
- Jensen SS, Terheyden H. *Bone augmentation procedures in localized defects in the alveolar ridge: clinical results with different bone grafts and bone-substitute materials*. Int J Oral Maxillofac Implants 24 Suppl (2009): 218–236.
- Jilka RL, Hangoc G, Girasole G, Passeri G, Williams DC, Abrams JS, Boyce B, Broxmeyer H, Manolagas SC. *Increased osteoclast development after estrogen loss: mediation by interleukin-6*. Science. 1992 Jul 3; 257(5066):88-91.

- Jiménez Garcia J, Berghezan S, Caramês JMM, Dard MM, Marques DNS. *Effect of cross-linked vs non-cross-linked collagen membranes on bone: A systematic review*. J Periodontal Res. 2017 Dec;52(6):955-964.
- Kalfas IH. *Principles of bone healing*. Journal of Neurosurgery.2001.
- 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.
- Kubasiewicz-Ross P, Hadzik J, Seeliger J, Kozak K, Jurczynszyn K, Gerber H, Dominiak M, Kunert-Keil C. *New nano-hydroxyapatite in bone defect regeneration: A histological study in rats*. Ann Anat. 2017 Sep;213:83-90.
- Lang NP, Pun L, Lau KY, et al. *A systematic review on survival and success rates of implants placed immediately into fresh extraction sockets after at least 1 year*. Clin Oral Implants Res 23 Suppl 5 (2012): 39–66.
- Le Nihouannen D, Saffarzadeh A, Aguado E, et al. *Osteogenic properties of calcium phosphate ceramics and fibrin glue based composites*. J Mater Sci Mater Med 18 (2007): 225–235.
- 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.
- Leventis M, Fairbairn P, Mangham C, Galanos A, Vasiliadis O, Papavasileiou D, Horowitz R. *Bone Healing in Rabbit Calvaria Defects Using a Synthetic Bone Substitute: A Histological and Micro-CT Comparative Study*. Materials (Basel). 2018 Oct 17;11(10).

- Lindhe J, Cecchinato D, Donati M, et al. *Ridge preservation with the use of deproteinized bovine bone mineral*. Clin Oral Implants Res 25 (2014): 786–790.
- Lindhe J, Lang NP, Karring T. *Parodontologia clinica e implantologia orale*. Quinta edizione. Edi Ermes
- Materiali e Tecnologie Odontostomatologiche*, a cura dei Docenti di Materiali Dentari e Tecnologie Protesiche 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.
- Milinkovic I, Cordaro L. *Are there specific indications for the different alveolar bone augmentation procedures for implant placement? A systematic review*. Int J Oral Maxillofac Surg 43 (2014): 606–625.
- Misch CE, Judy KW. *Classification of partially edentulous arches for implant dentistry*. Int J Oral Implantol.1985; 4(2):7-13.
- Misch CE. *Density of bone: effect on treatment plans, surgical approach, healing, and progressive bone loading*. Int J Oral Maxillofac Implants.1990;6:23-31).
- Nyström E, Nilson H, Gunne J, et al. *A 9-14 year follow-up of onlay bone grafting in the atrophic maxilla*. Int J Oral Maxillofac Surg 38 (2009): 111–116.
- Orsini G, Scarano A, Degidi M, et al. *Histological and ultrastructural evaluation of bone around Bio-Oss® particles in sinus augmentation*. Oral Diseases 13 (2007): 586–593.

- Pagni G, Pellegrini G, Giannobile WV, et al. *Postextraction alveolar ridge preservation: biological basis and treatments*. Int J Dent 2012 (2012): 151030.
- Palachur D, Prabhakara Rao KV, Murthy KRV, et al. *A comparative evaluation of bovine-derived xenograft (Bio-Oss Collagen) and type I collagen membrane (Bio-Gide) with bovine-derived xenograft (Bio-Oss Collagen) and fibrin fibronectin sealing system (TISSEEL) in the treatment of intrabony defects: A clinico-radiographic study*. J Indian Soc Periodontol 18 (2014): 336–343.
- Park S-H, Lee K, Oh T-J, et al. *Effect of absorbable membranes on sandwich bone augmentation*. Clin Oral Implants Res 19 (2008): 32–41.
- Peters CL, Hines JL, Bachus KN, Craig MA, Bloebaum RD. *Biological effects of calcium sulfate as a bone graft substitute in ovine metaphyseal defects*. Journal of Biomedical Materials Research Part A. 2006
- Pietrokovski J, Massler M. *Alveolar ridge resorption following tooth extraction*. J Prosthet Dent 17 (1967): 21–27.
- 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.
- 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.
- Ripamonti U, Herbst NN, Ramoshebi L. *Bone Morphogenetic Proteins in Craniofacial and Periodontal Tissue Engineering: Experimental Studies in the Non-Human Primate Papio Ursinus*. Cytokine Growth Factor Rev. 2005 Jun;16(3):357-68

Robbins e Cotran. *Le basi patologiche delle malattie. Patologia generale*. Elsevier.

Rosati P., Colombo R., Maraldi N., Istologia. Edi Ermes, 2006.

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

Ross MH, Pawlina W. Istologia. Testo e Atlante con elementi di Biologia cellulare e molecolare. Casa Editrice Ambrosiana, 2010

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

Schilephanke H. Bone Growth Factors in Maxillofacial Skeletal Reconstruction. Int J Oral Maxillofac Surg. 2002 Oct;31(5):469-84

Schropp L, Wenzel A, Kostopoulos L, et al. Bone healing and soft tissue contour changes following single-tooth extraction: a clinical and radiographic 12-month prospective study. Int J Periodontics Restorative Dent 23 (2003): 313–323.

Scipioni A, Bruschi GB, Calesini G. The Edentulous Ridge Expansion Technique: A Five-Year Study. Int J Periodontics Restorative Dent. 1994 Oct;14(5):451-9.

Scipioni A, Calesini G, Micarelli C, Coppè S, Scipioni L. Morphogenic Bone Splitting: Description of an Original Technique and Its Application in Esthetically Significant Areas. Int J Prosthodont. Sep-Oct 2008;21(5):389-97

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

Sherft JP, Groot CG. The electro microscopic structure of the osteoblast. In: Bonucci R, Motta PM, ed. *Ultrastructure of skeletal tissues: bone and cartilage in health and disease*.

- Simion M, Jovanovic SA, Tinti C, et al. *Long-term evaluation of osseointegrated implants inserted at the time or after vertical ridge augmentation. A retrospective study on 123 implants with 1-5 year follow-up.* Clin Oral Implants Res 12 (2001): 35–45.
- Sodek J, McKee MD. *Molecular and cellular biology of alveolar bone.* Periodontol 2000. 2000 Oct; 24:99-126. Review.
- Sodek J, Overall CM. *Matrix metalloproteinases in periodontal tissue remodeling.* Matrix Suppl. 1992;1:352-62. Review.
- 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
- Starch-Jensen T, Becktor JP. *Maxillary Alveolar Ridge Expansion with Split-Crest Technique Compared with Lateral Ridge Augmentation with Autogenous Bone Block Graft: a Systematic Review.* J Oral Maxillofac Res. 2019 Dec 30;10(4):e2.
- 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 12month randomized controlled clinical trial.* J Periodontol. 2009 Nov; 80(11): 1774-82.
- Sykaras N, Opperman L. *Bone Morphogenetic Proteins (BMPs): How Do They Function and What Can They Offer the Clinician?* J Oral Sci. 2003 Jun;45(2):57-73
- 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.

- Tan WL, Wong TLT, Wong MCM, et al. *A systematic review of post-extraction alveolar hard and soft tissue dimensional changes in humans*. Clin Oral Implants Res 23 Suppl 5 (2012): 1–21.
- Tavtigian R *The height of the facial radicular alveolar crest following apically positioned flap operations*. Journal of Periodontology 1970;41:412-418
- Ten Heggeler JM a. G, Slot DE, Van der Weijden GA. *Effect of socket preservation therapies following tooth extraction in non-molar regions in humans: a systematic review*. Clin Oral Implants Res 22 (2011): 779–788.
- 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. *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*. Int J Periodontics Restorative Dent 2018 Mar 7
- Troeltzsch M, Troeltzsch M, Kauffmann P, et al. *Clinical efficacy of grafting materials in alveolar ridge augmentation: A systematic review*. J Craniomaxillofac Surg 44 (2016): 1618–1629.
- 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
- Van der Weijden F, Dell’Acqua F, Slot DE. *Alveolar bone dimensional changes of post-extraction sockets in humans: a systematic review*. J Clin Periodontol 36 (2009): 1048–1058.

Wilderman MN, *Repair after a periosteal retention procedure*. Journal of Periodontology 1963; 34:487-503

Wilderman MN, Wentz F, Orban BJ, *Histogenesis of repair after mucogingival surgery*. Journal of Periodontology 1960; 31:283-284

Wood DL, Hoag PM, Donnenfeld WO, Rosenfeld LD, *Alveolar crest reduction following full and partial thickness flaps*. Journal of Periodontology 1972; 42:141-144

9 RINGRAZIAMENTI

Sono arrivato a compimento di questo capitolo della mia vita e molti sono i ringraziamenti che vorrei fare.

Innanzitutto desidero ringraziare il Professor Fabrizio Bambini, cardine prezioso in questi ultimi anni di università, il quale è stato per me più di un semplice relatore: ha saputo andare ben oltre il suo ruolo da professore, accogliendomi come un figlio, e come tale sostenendomi passo dopo passo e spronandomi, in modo anche incisivo, quando necessario, durante questi anni. Desidero ringraziarlo per le opportunità che in tre anni mi ha offerto, facendo crescere in me la passione per questa professione e aiutandomi anche a crescere come persona. Con lui ho sicuramente imparato a conoscere la stima per il professionista e l'uomo; da parte mia, mi auguro di aver lasciato in lui un ricordo piacevole.

Desidero inoltre ringraziare il Dott. Andrea Grassi, odontoiatra in Reggio Emilia, senza il cui materiale questo studio clinico sperimentale non ci sarebbe stato.

Infine, un ringraziamento speciale, e di cuore, va alla Dottoressa Lucia Memè, alla dottoressa Giulia Orilisi e alle assistenti Federica Copparoni e Federica Solazzi. Mi avete fatto sentire in famiglia, mi avete aiutato nei momenti di disorientamento e sostenuto nei momenti di sconforto. Anche se sono consapevole che la strada della formazione è ancora lunga, molto di ciò che ora so lo devo a voi.

A voi un grazie speciale, siete e rimarrete sempre parte di me.