



UNIVERSITA' POLITECNICA DELLE MARCHE

Facoltà di Medicina e Chirurgia

Corso di Laurea in Odontoiatria e Protesi Dentaria

Presidente: Prof. Maurizio Procaccini

**DENTINA DEMINERALIZZATA NELLA
RIGENERAZIONE OSSEA: VALUTAZIONE DELLE
DIVERSE PERCENTUALI DI DEMINERALIZZAZIONI**

Relatore: Chiar.mo

Prof. Fabrizio Bambini

Tesi di Laurea di:

Pietro Paleino

Anno Accademico 2019-2020

INDICE

INTRODUZIONE.....	4
1. DENTINA.....	5
1.1 DENTINOGENESI.....	7
1.2 ORGANIZZAZIONE STRUTTURALE.....	8
1.3 COMPOSIZIONE INORGANICA E ORGANICA.....	13
1.4 GROW FACTOR DI DERIVAZIONE DENTINALE.....	21
2. TESSUTO OSSEO.....	23
2.1 CRESCITA E SVILUPPO.....	24
2.2 ORGANIZZAZIONE E STRUTTURA.....	26
2.3 FUNZIONE.....	37
2.4 PRINCIPI DI GUARIGIONE.....	41
3. DENTINA DEMINERALIZZATA COME BIOMATERIALE	45
3.1 SOMIGLIANZE CON IL TESSUTO OSSEO.....	46
4.2 L'IMPORTANZA DELLA DEMINERALIZZAZIONE.....	48
4.3 SOSTANZE DEMINERALIZZANTI.....	54
4. PARTE SPERIMENTALE.....	59
4.1. OBIETTIVO.....	59
4.2 MATERIALI E METODI.....	61
4.2.1. PREPARAZIONE DEI CAMPIONI.....	61
4.2.2 PROTOCOLLI DI DEMINERALIZZAZIONE.....	63
4.2.3 ANALISI STRUMENTALI.....	65
5. RISULTATI.....	73
6. DISCUSSIONE.....	82
7. CONCLUSIONI.....	84
8. BIBLIOGRAFIA.....	85

INTRODUZIONE

Il dente come biomateriale per la rigenerazione ossea è stato iniziato a studiare già nel 1967. L'utilizzo del dente, in particolare della dentina, come materiale da innesto osseo potrebbe rappresentare una valida alternativa nel vasto panorama dei biomateriali attualmente in uso. È un materiale autologo, il costo biologico è di gran lunga inferiore agli innesti ossei e presenta una maggiore capacità osteoinduttiva e osteoconduttiva rispetto agli innesti allogenici e xenogenici.

La composizione chimica dei denti e dell'osso è molto simile, in particolare la dentina che è considerata un tessuto osseo specializzato.

Il dente è composto da diversi tessuti: smalto, cemento e dentina. Lo smalto contiene il 96% di sostanze inorganiche (idrossiapatite) e il 4 % di acqua e matrice organica, mentre il cemento è composto da 45-50% da sostanze inorganiche e dal 50-55% da sostanze organiche e acqua.

La dentina contiene il 65% di sostanze inorganiche e il 35% di sostanze organiche e acqua, così come l'osso alveolare che è formato dal 65% di sostanze inorganiche e dal 35% di sostanze organiche. Quello che cambia tra i due sono le dimensioni: nel tessuto osseo le stringhe di idrossiapatite sono 10 volte più piccole rispetto quelle della dentina. La parte organica della dentina, 35%, costituita per il 90% da collagene di tipo I, esattamente lo stesso che si trova nel tessuto osseo. Il restante 10% della componente organica della dentina costituita dalle stesse proteine che troviamo nell'osso, essendo la dentina un tessuto autologo. Tra queste proteine abbiamo l'osteocalcina, l'osteonectina, le fosfoproteine e le sialoproteine, ognuna delle quali con un ruolo fondamentale nel processo di formazione e mineralizzazione dell'osso. La matrice dentinale ricca di fattori di crescita, tra cui le BMP, che promuovono la formazione di osso, favorendo la differenziazione di cellule staminali mesenchimali in condroblasti e cellule osteogenetiche. Le BMP sono molto solubili e se vengono utilizzate per scopi rigenerativi si iniziano a disperdere, quindi hanno bisogno di carrier. In questo caso le BMP sono presenti in un carrier naturale che è la dentina.

Molti studi in letteratura hanno confermato la presenza delle BMP anche dopo il processo di demineralizzazione dentinale. Questo processo estremamente importante perché la demineralizzazione permette il riassorbimento dei granuli, rinunciando ad una quantità di idrossiapatite. Lo potremo definire come quel processo che permette di far assomigliare la dentina, ancora di più, al tessuto osseo. La demineralizzazione importante perché ci permette l'utilizzo della dentina: se la dentina non è demineralizzata, gli osteoclasti non riescono, o comunque riescono poco, ad assorbirla. In questa fase di riassorbimento della dentina, abbiamo la liberazione delle BMP che sono imprigionate all'interno della dentina.

Poiché i protocolli di preparazione della dentina sono di fondamentale importanza per l'estrinsecarsi delle sue proprietà osteoinduttive e osteoconduttive, in questa tesi è stato studiato e analizzato il miglior protocollo di demineralizzazione, in termini di tempistiche di demineralizzazione, utilizzando l'EDTA ad una concentrazione del 12%. La percentuale e la scelta dell'uso dell'EDTA è stata scelta sulla base della letteratura scientifica.

1. DENTINA

La dentina è un tessuto connettivo mineralizzato, acellulare e privo di vascolarizzazione che costituisce la parte più ampia di struttura dentale. È ricoperta esternamente da smalto sulla corona anatomica e dal cemento sulla radice; internamente forma le pareti della cavità pulpare.

Gli odontoblasti sono cellule responsabili della produzione di dentina derivate dal mesenchima della papilla dentale che, grazie alle interazioni epitelio-mesenchimali, vanno incontro a un processo di differenziamento.

A differenza di quanto accade per lo smalto, la produzione di dentina non termina al momento della formazione del dente, ma prosegue nel tempo provocando una progressiva diminuzione di volume dello spazio endodontico. È pertanto possibile distinguere:

- Dentina primaria: prodotta durante l'odontogenesi fino all'eruzione del dente nel cavo orale;
- Dentina secondaria: si forma fisiologicamente, in modo lento ma continuo, per tutta la vita del dente, sia nei denti normali erotti sia in quelli inclusi e afunzionali, riducendo così l'estensione della camera pulpare e dei canali radicolari. Negli elementi posteriori la deposizione di dentina non è uniforme, ma avviene prevalentemente in corrispondenza del pavimento e del tetto della camera pulpare, soprattutto a livello dei cornetti;
- Dentina terziaria: rappresenta l'epifenomeno di una manifestazione reattiva, spesso di carattere difensivo nei confronti di aggressioni intense o ripetute determinate sostanzialmente dai batteri, da traumi o da interazioni con materiali da restauro. Questa può essere tubulare, se gli stimoli irritativi che l'hanno provocata sono blandi, o tubulare, per l'incapacità da parte dei fibroblasti e delle cellule mesenchimali di differenziarsi in odontoblasti di produrre nuovo substrato collagenico.

debitamente strutturato.

In base al rapporto che contrae con i tubuli dentinali, si possono distinguere due tipologie differenti di dentina:

- **Dentina peritubulare:** strato di dentina ipermineralizzata che riveste la parete interna dei tubuli dentinali. depositata continuamente. Con l'età si assiste ad una graduale riduzione del diametro dei tubuli fino alla completa oblitterazione.
- **Dentina intertubulare:** strato di dentina presente tra i tubuli dentinali. meno mineralizzata della dentina peritubulare.

1.1 DENTINOGENESI

Intorno alla diciottesima settimana di vita intrauterina inizia la formazione dei tessuti duri del dente, attraverso i processi di dentinogenesi e amelogenesi. La dentinogenesi precede sempre l'amelogenesi e avviene attraverso la secrezione da parte di odontoblasti, della predentina, ricca di fibre collagene e sostanza fondamentale, e la sua successiva mineralizzazione. La secrezione della predentina ha inizio in corrispondenza del versante degli odontoblasti che guarda alla membrana basale, a livello dei siti in cui si formeranno le cuspidi o il margine incisale. Più precisamente, quando nel sovrastante organo dello smalto le cellule epiteliali dello strato interno iniziano a dividersi e a secernere una lamina basale formata da GAG e da collagene di tipo I e IV, avviene la differenziazione odontoblastica, che inizia con la fase G2 della mitosi e comprende in successione:

1. La polarizzazione dei nuclei degli odontoblasti stessi;
2. La sintesi della matrice della predentina costituita da sostanza fondamentale amorfa di proteoglicani e di collagene di I tipo;
3. La crescita del processo citoplasmatico odontoblastico
4. La comparsa di vescicole intracitoplasmatiche per la distruzione della lamina basale.

A questo punto i "pulpoblasti" producono fibre collagene giovani, dette di von Korff, di 600 di diametro medio, dirette con andamento radiale verso la

membrana preformativa e destinate a essere centro di nucleazione per i cristalli di idrossiapatite, che formeranno il vero e proprio tubulo dentinale. Quando la predentina avrà raggiunto uno spessore di 10-20 micron, inizierà la sua calcificazione per via globulare con formazione di cristalli di idrossiapatite. In particolare, si formano la dentina mantellare (le cui fibre collagene sono perpendicolari alla giunzione smalto-dentina) e la dentina circumpulpare (le cui fibre collagene sono perpendicolari ai tubuli dentinali). La dentina mantellare presenta una caratteristica mineralizzazione lineare, con la deposizione di cristalli lungo un fronte ininterrotto; la dentina circumpulpare si mineralizza attraverso un processo globulare che consiste nella deposizione di cristalli in numerose differenti aree della matrice, finché tali masse globulari aumentano di volume per fondersi in un'unica massa calcificata.

In ogni modo uno strato di predentina è sempre presente sopra gli odontoblasti, i quali, man mano che depongono nuovi strati, si spostano all'interno, prolungando i loro processi citoplasmatici all'interno della struttura minerale appena formata.

Questa caratteristica sintesi incrementale del tessuto dentinale, con fasi alterne di secrezione e conseguente mineralizzazione, determina al suo interno la comparsa delle caratteristiche linee di accrescimento, dette di von Ebner o di Owen.

Contemporaneamente alla dentinogenesi, le cellule mesenchimali della papilla dentale si organizzano e assumono il caratteristico aspetto del tessuto connettivo della polpa.

1.2 ORGANIZZAZIONE STRUTTURALE

Fisiologicamente e anatomicamente, la dentina è una struttura complessa in quanto all'interno possiamo trovare diversi tipi di strati di dentina. Le strutture più distintive del tessuto dentinale sono i **tubuli dentinali**: microscopici canali formati da un intreccio di fibre collagene frammisti a cristalli di idrossiapatite. I tubuli convergono in direzione della polpa e il numero dei tubuli aumenta progressivamente verso la camera pulpare: si passa da una densità di 15000

mm per la dentina superficiale, a 45000mm per quella profonda. Analogamente al numero, anche il diametro varia da 0,8 micron per i tubuli superficiali fino a 2,5 micron per i tubuli profondi.

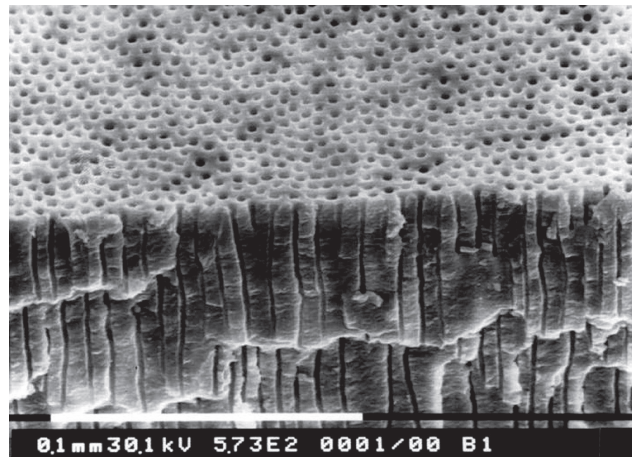


Figura 1. Foto al SEM di tubuli dentinali tagliati longitudinalmente.

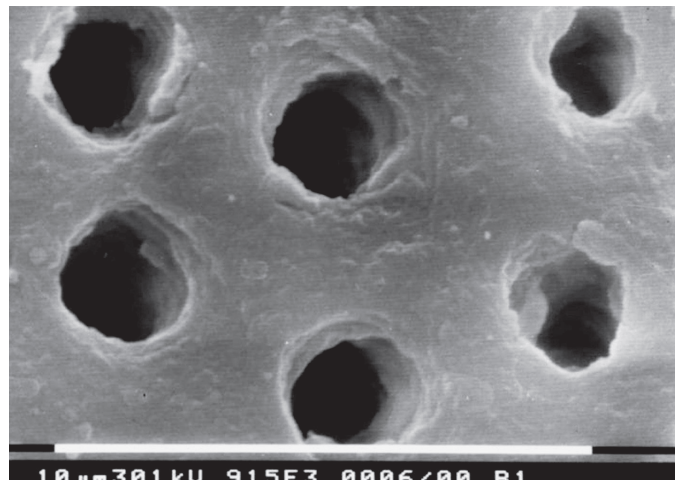


Figura 2. Gli stessi tubuli a maggiore ingrandimento.

All'interno ciascun tubulo rivestito da una guaina propria (detta di Neuman) e contiene la fibra di Tomes, il processo citoplasmatico periferico degli odontoblasti, insieme a piccole fibre nervose; fra la guaina e la fibra di Tomes sembra esistere uno spazio capillare per la circolazione di plasma nutritivo. Tra

il processo odontoblastico e il tubulo dentinale presente una zona chiamata spazio periodontoblastico, il cui spessore, molto esiguo in vicinanza della polpa, aumenta man mano che ci si allontana dalla predentina. In questo spazio contenuto il fluido dentinale che, per le particolari proteine e ioni presenti, può essere considerato un trasudato o filtrato dei capillari della polpa. Lo spazio periodontoblastico e il fluido dentinale costituiscono una via attraverso la quale varie sostanze possono raggiungere la giunzione smalto-dentina.

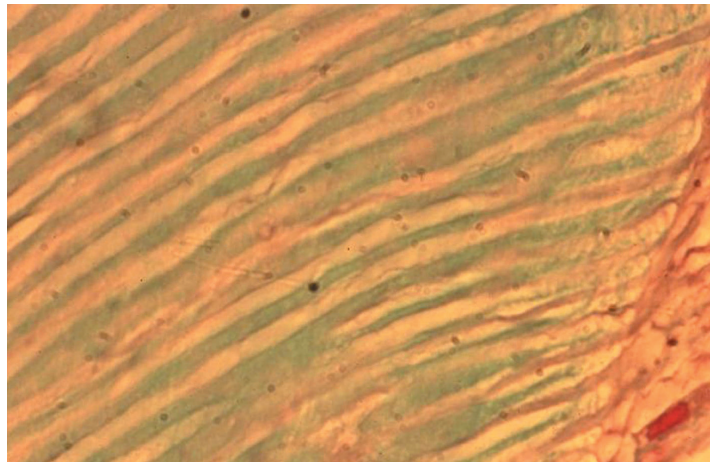


Figura 3. *Tubuli dentinali tagliati longitudinalmente: si notano i prolungamenti citoplasmatici degli odontoblasti (fibrille di Tomes) all'interno dei tubuli.*

La dentina può essere divisa in tre regioni, ognuna con caratteristiche proprie: la predentina, la dentina circumpulpare e la dentina mantellare.

LA PREDENTINA

La predentina è uno strato non mineralizzato, di 20-75 µm di spessore, posto tra la polpa e la dentina circumpulpare. Le fibrille collagene di tipo I sono disposte parallelamente alla linea di confine tra polpa e dentina a formare reti sovrapposte, ma intrecciate in modo disordinato e multidirezionale. Gli odontoblasti secernono collagene di tipo I che diventa sempre più compatto: in prossimità del fronte di mineralizzazione si ha la deposizione di idrossiapatite,

sul collagene neoformato, grazie anche alla presenza di proteine non collageniche che vengono rilasciate in questa zona, le quali modulano la crescita e la disposizione dei cristalli (Goldberg et al., 2011). Nella predentina prossimale, gli odontoblasti sono responsabili della secrezione di collagene nativo di tipo I, insieme ad alcuni PG (decorina (DCN), bigcanca (BGN), lumicano (Lu), fibromodulina (Fmod)) implicati nella fibrillazione del collagene (Goldberg et al., 2005). Nella predentina prossimale (vicino ai corpi cellulari) il diametro medio delle fibrille di collagene è di circa 20 nm, mentre nella parte centrale il diametro medio raggiunge i 40 nm, e nella parte distale, vicino al fronte di mineralizzazione, il diametro delle fibrille varia tra 55-75 nm (Goldberg et al., 2004). La predentina può essere, dunque, considerata una zona di maturazione delle fibre collagene e di inibizione della mineralizzazione. Essa si forma e persiste durante tutta la vita del dente, dal momento che la formazione di dentina continua e prevede la primaria e indispensabile deposizione di predentina, che viene mineralizzata alla stessa velocità con la quale si forma (lo spessore della predentina rimane quindi costante).

Al di sopra della predentina il confine con la dentina circumpulpare è segnato dalla presenza di strutture globulari, i calcoglobuli o i calcosferiti, che rappresentano il fronte di mineralizzazione della dentina. Durante le prime fasi della mineralizzazione i cristalli di idrossiapatite vengono depositati dentro e attorno alle fibre collagene della predentina in forma di ammassi sferici, destinati ad accrescersi in senso centrifugo e, quindi, a fondersi per formare la dentina mineralizzata.

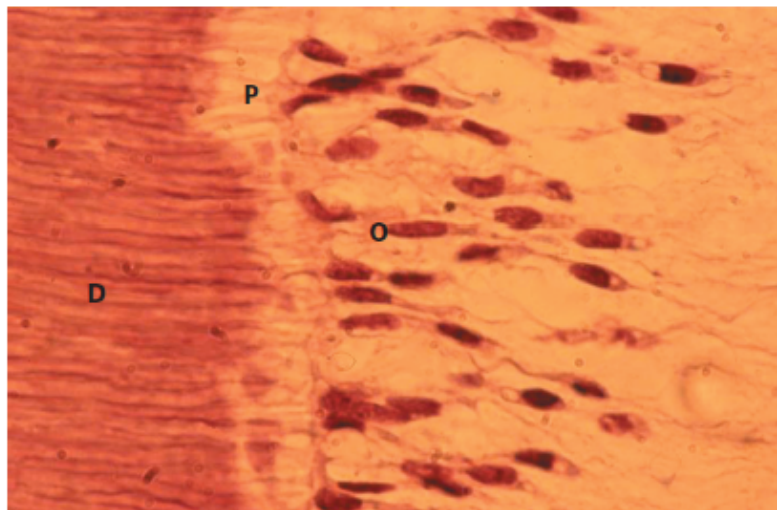


Figura 4. *Quadro istologico di una polpa normale: si nota chiaramente la dentina tubulare (D), la predentina (P) e lo strato di odontoblasti (O).*

DENTINA CIRCUMPULPARE

La dentina circumpulpale costituisce la parte più grande dello strato di dentina. Sottile durante le fasi iniziali della dentinogenesi, il suo spessore aumenta continuamente (circa 4 micrometri / giorno) a discapito dello spazio inizialmente occupato dalla polpa. A causa di questa ritmicità si vengono ad evidenziare delle linee incrementali, che prendono il nome di linee di Von Ebner le quali si trovano a una distanza di circa 4-8 μ m l'una dall'altra (Kumar, 2011).

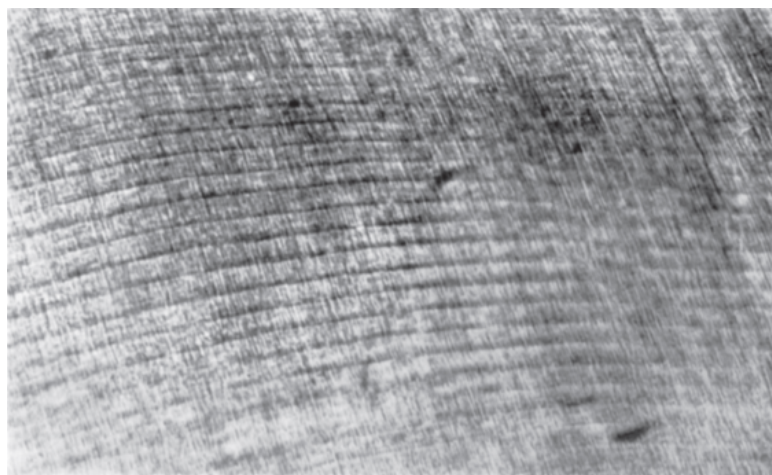


Figura 5. *Linee incrementali di Von Ebner (Schour, 1936).*

La disposizione delle diverse tipologie di dentina non è omogenea.

La dentina intertubulare è la più rappresentata e occupa lo spazio che separa i tubuli dentinali.

È costituita da una matrice extracellulare ricca di collagene, con cristalli di idrossiapatite disposti parallelamente all'asse lungo di queste fibre (Kumar, 2011). La formazione di dentina intertubulare prevede un'iniziale deposizione di una matrice extracellulare non mineralizzata da parte degli odontoblasti, nello strato predentinico, che, successivamente, andrà incontro a maturazione.

La dentina peritubulare forma la parete dei tubuli dentinali e presenta delle fenestrazioni che consentono il passaggio sia di sostanze dalla dentina intertubulare all'interno dei tubuli che del fluido dentinale (Gotliv et Veis, 2007).

La dentina peritubulare va incontro a un processo di mineralizzazione passivo che coinvolge alcune molecole della matrice extracellulare non collagenica, in particolare lipidi e proteoglicani, le quali fungono da mediatori della formazione di cristalli di idrossiapatite attorno agli odontoblasti (Goldberg et al., 2011). La dentina intertubulare, non contiene fibre di collagene e ha una differente composizione della matrice (Gotliv et Veis, 2007).

DENTINA MANTELLARE

La dentina mantellare è un sottile strato periferico dallo spessore di 15-30 μ m. Differisce dalla dentina circumpulpare per una diversa disposizione e un maggiore diametro delle fibre di collagene.

Questo è principalmente uno strato atubolare. La matrice extracellulare costituita dalle cosiddette fibre di Von Korff (Linde et Goldberg, 1993), le quali sono formate prevalentemente da collagene di tipo III, presentano un diametro elevato (0,1-0,2 μ m) e, una volta secrete, vanno a disporsi perpendicolarmente rispetto alla giunzione amelo-dentinale (Kumar, 2011). Le funzioni di questo strato periferico non sono state chiaramente stabilite. Tuttavia, alcune ipotesi possono essere tratte dalle loro proprietà fisiche e chimiche: le misurazioni che utilizzano la microdurezza di Vickers mostrano un graduale aumento della durezza andando verso la parte più esterna (Wang et Weiner, 1998). Questo strato mantellare è meno mineralizzato, e di conseguenza la dentina, che quindi è più resiliente, può essere adattata per dissipare le pressioni o le forze che altrimenti indurrebbero fessure dello smalto e distacco dello smalto frammentato dalla giunzione dentina-smalto (Goldberg et al., 2005).

A livello radicolare la dentina mantellare è identificata nei primi due strati depositi dagli odontoblasti radicolari: ialino di Hopewell-Smith e granulare di

Tomes, che insieme raggiungono uno spessore di 30 μ m (Goldberg et al., 2011).

1.3 COMPOSIZIONE INORGANICA E ORGANICA

La dentina è costituita per il 70% in peso da materiale inorganico (che rappresenta il 50 % in volume), per il 18% da matrice organica (25% in volume) e per il 12 % d'acqua (25% in volume).

COMPOSIZIONE DENTINA		
MATERIALE INORGANICO	70% in peso	50% in volume
MATERIALE ORGANICO	18% in peso	25% in volume
ACQUA	12% in peso	25% in volume

Tabella 1. *Composizione strutturale dentina.*

Il **materiale inorganico** è formato principalmente da idrossiapatite più piccoli rispetto a quelli che troviamo nello smalto. Sono presenti piccole quantità di fosfati, carbonati e solfati. Nei cristalli di idrossiapatite sono presenti pochi ioni calcio ed un alto contenuto di carbonio (Kumar, 2011).

MATRICE ORGANICA

Il **collagene** è la principale proteina presente nella dentina. Costituisce circa il 90% della matrice organica. La maggior parte del collagene è di tipo I, sebbene siano state riportate tracce di tipo III e V: circa il 3% delle fibrille di collagene composto da collageni di tipo III e / o di tipo V.

Il collagene di tipo I è costituito dall'autoassemblaggio di due catene alfa 1 e una catena alfa 2 (89%), mentre nell'11 % è formato da tre catene alfa 1. Queste catene si intrecciano in una tripla elica con formazione spirale (Hug et al. 2005).

Quest'ultima va ad associarsi in una struttura quasi esagonale, formata dall'unione di cinque triple eliche, andando a costituire una microfibrilla (Orgel et al. 2006). Le microfibrille, che hanno un diametro di circa 5-6 nanometri (Bertassoni et al. 2017) si uniscono poi lateralmente in una struttura più grande, la fibrilla, di diametro variabile tra 80 e 100 nm (Habelitz et al., 2002).

Caratteristica di questa fibrilla è la presenza di bande trasversali che si ripetono ogni 67 nm, dovute alla disposizione sfalsata delle molecole di collagene che le costituiscono (Bertassoni et al. 2012).

Il restante 10% della matrice organica è costituita da molecole **non collageniche (PCN)**, molto importanti per l'omeostasi del tessuto (Bertassoni et al., 2017). Oltre al mantenimento dell'omeostasi sono implicate nei processi di mineralizzazione della dentina e nella regolazione dell'attività cellulare, regolando l'espressione genica.

Le proteine fosforilate formano un primo gruppo di molecole. La famiglia delle glicoproteine (**SIBLING**, Small Integrin-Binding Ligand, N-linked Glycoproteins) sembra svolgere un ruolo cruciale nella dentinogenesi.

Sono stati inizialmente trovati nei tessuti mineralizzati (ossa e denti), ma sono stati anche identificati anche nei tessuti molli come ghiandole salivari, tumori renali e prostatici.

Nella dentina, la famiglia SIBLING comprende:

1. **DSPP** (Dentin SialoPhosphoProtein), immediatamente scissa dopo secrezione in dentina sialoproteina (DSP), glicoproteina dentina (DGP) e fosfoproteina dentina (DPP);
2. Proteina della matrice di tipo 1 (**DMP-1**);
3. Sialoproteina ossea (**BSP**);
4. Osteopontina (**OPN**);
5. Proteina fosfoglicolare extracellulare (**MEPE**).

DSPP

La sialofosfoproteina dentinale (DSPP) espressa principalmente nella dentina, ma non esclusivamente. Il gene DSPP si trova sul cromosoma 4 locus q22.1.

Si divide immediatamente dopo la secrezione di MMP2 (metallo proteinasi 2) e MMP20 (metallo proteinasi 20) in tre molecole figlie:

1. La Sialoproteina dentinale (**DSP**). La sialoproteina dentinale (DSP) proviene dalla parte N-terminale del DSPP. una molecola poco fosforilata, ricca di acido aspartico, acido glutammico, glicina e serina, correlata a sialoproteine (acido sialico al 9%) (Steiglitz et al. 2004). Rispetto alle altre proteine ECM, il DSP sembra essere un regolatore della mineralizzazione meno efficace, sebbene inibisca la formazione e la crescita dei cristalli minerali di fosfato di calcio (Narayanan K et al. 2006).
2. La glicoproteina dentinale (**DGP**). Scoperto nell'estratto di dentina di maiale (Yamakoshi et al. 2008), non stato determinato se la molecola sia presente in altre specie e di conseguenza se abbia qualche ruolo nel processo di dentinogenesi.
3. La fosfoproteina dentinale (**DPP**): un prodotto di scissione dal lato C-terminale di DSPP. una proteina altamente acida ricca di fosfoerina con un alto contenuto di acido aspartico. DPP rappresenta oltre il 50% del PCN nella maggior parte della dentina. DPP si lega a calcio, HA e collagene e induce la mineralizzazione intrafibrillare.

DPP presenta una regione di codifica del dominio C-terminale, denominata DMP2 (proteina della matrice dentinale 2). Questa parte non fosforilata e quindi ha una bassa capacita di legare il calcio.

DPP coinvolto nella maturazione della dentina mineralizzata. DPP provoca la nucleazione a basse concentrazioni e l'inibizione della crescita dei cristalli ad alte concentrazioni (Zhang, Tu, Chen 2009- Chen et al. 1992). La fosfoforina viene assorbita

preferibilmente sulla faccia dei cristalli minerali (non fisiologici) di grandi dimensioni.

DMP-1

La proteina della matrice dentinale di tipo 1 (DMP-1) è un NCP acido altamente fosforilato potenzialmente glicosilato caratterizzata dalla presenza di domini acidi, la quale viene processata in tre frammenti: COOH-terminale, NH₂-terminale (Qin et al. 2007). Con un peso molecolare di 53,5 kDa, DMP-1 possiede 93 serine e 12 treonine nel contesto appropriato per la fosforilazione. La molecola è molto simile alla glicoproteina acida ossea (BAG75). DMP-1 interagisce con altre molecole, regola la trascrizione del gene DSPP (Gorter de Vrier et al. 1987) ed è downregolato da TGF beta1. La molecola è presente in odontoblasti, tubuli dentinali e ameloblasti. DMP-1 svolge un ruolo nella dentinogenesi.

Studi in vitro dimostrano che DMP-1 è coinvolto nella regolazione della biomineralizzazione, che può essere dovuta alla sua capacità di legare il calcio. Si lega anche con grande affinità alle fibrille di collagene. Ha la capacità di indurre nucleazione eterogenea di cristalli di calcio-fosfato e regola la crescita dei cristalli (Bronckers et al.. 1998).

Studi in vivo sui topi con deficit di DMP-1 suggeriscono che esiste un effetto diretto della molecola sulla formazione minerale e sulla crescita dei cristalli e un effetto indiretto sulla regolazione della concentrazione di Ca x P e del turnover della matrice (Chun et al.. 2006).

La mutazione DMP-1 è importante in una forma autosomica recessiva di rachitismo ipofosfatemico. La regolazione dell'omeostasi del fosfato avviene attraverso il fattore di crescita dei fibroblasti 23 (FGF23) (Holland et al.. 1987). La delezione di DMP-1 induce il parziale fallimento della maturazione della predentina in dentina e ipomineralizzazione e provoca l'espansione della polpa e delle cavità del canale radicolare durante lo sviluppo postnatale.

BSP

La sialoproteina dell'osso svolge un ruolo nel processo di biomineralizzazione. BSP costituisce ~ 1% del PCN totale nella dentina (Somogyi et al., 2004). La molecola è modificata post-traduzione mediante la glicosilazione, fosforilazione e solfatazione. Il peso molecolare di questa glicoproteina è di 60-80 kDa.

BSP è caratterizzato dalla ripetizione di diversi segmenti di acido poligluttammico e da un motivo arginina-glicina-aspartato (RGD) che media l'attaccamento cellulare. È stato dimostrato che promuove la formazione iniziale di cristalli minerali in vitro, con la capacità nucleazionale che dipende sia dall'entità della fosforilazione che dal dominio che si lega alla superficie minerale (Orimo 2010).

BSP è un marker di differenziazione osteogenica (Orimo 2010).

La BSP si trova solo nella dentina terziaria (Moses et al., 2006).

ALTRE PROTEINE DELLA ECM FOSFORILATE

Il ruolo di altre molecole di dentina ECM è più ambiguo, sia perché sono molecole onnipresenti, sia perché agiscono come inibitori della mineralizzazione in molti modelli biologici. Questo è il caso di osteopontina, MEPE e osteocalcina, e poco si sa circa le loro funzioni nella dentinogenesi.

OSTEOPONTINA (OPN). L'osteopontina è una sialoproteina variamente fosforilata, caratterizzata dalla presenza di una sequenza di acido poliassiale e da siti di fosforilazione Ser / Thr che mediano il legame HA.

L'OPN non è solo una proteina strutturale ma anche una molecola matricellulare, implicata nei processi infiammatori (Goldberg et al., 2009).

Uno studio mostra come l'osteopontina sia necessaria affinché avvenga la secrezione di collagene di tipo I da parte delle cellule della polpa durante il processo di produzione della dentina di riparazione (Saito et al. 2016). Si può concludere che la fosforilazione dell'OPN è un fattore

importante nella regolazione di un processo di mineralizzazione.

MEPE/ OF45 (OSTEOREGULINA). La fosfoglicoproteina extracellulare della matrice (MEPE) ha una porzione centrale, una sequenza di attaccamento del glicosaminoglicano (SGDG) e un motivo putativo che lega il calcio.

Nell'osso, MEPE sembra essere un inibitore della mineralizzazione.

In vitro è stato dimostrato che la proteina intatta fosforilata è un efficace promotore della mineralizzazione nel sistema di diffusione della gelatina. MEPE defosforilato e peptide ASARM (acido serina e aspartato) defosforilato non hanno alcun effetto sulla mineralizzazione (Waddington et al. 2003).

In vivo è stato dimostrato la porzione centrale di MEPE (dentonina) efficace nel promuovere la differenziazione delle cellule della polpa in progenitori di odontoblasti / osteoblasti. L'immunocolorazione con un anticorpo anti-MEPE colora la predentina, ma non la dentina. La mancanza di colorazione della metadentina suggerisce che non vi è alcuna influenza della molecola sulla formazione di dentina intertubulare (Irving 1958).

ALTRE MOLECOLE DI ECM

OSTEOCALCINA (OCN). Una certa confusione sorge tra l'osteocalcina (BGP) e la proteina della matrice ossea (MGP). Solo i tessuti mineralizzati sintetizzano la BGP (OC), mentre la MGP è sintetizzata dai tessuti molli, forse come un tentativo di impedire la loro calcificazione.

La localizzazione immunocitochimica dell'OCN nei denti di ratto mostra una colorazione più positiva nella dentina del mantello e una colorazione molto minore nella dentina circumpulpale (Fincham et al. 1972).

La microscopia a infrarossi trasformata di Fourier (FT-IRM) suggerisce che l'OCN è necessario per stimolare la maturazione minerale ossea o il rimodellamento degli osteoclasti. Studi in letteratura suggeriscono che i livelli di OCN prodotti localmente non sono sufficienti per influenzare la

dentinogenesi (Goldberg et al., 2002). Non è chiaro, tuttavia, perché una proteina coinvolta nel rimodellamento e nell'azione degli osteoclasti dovrebbe essere presente in un tessuto in cui vi è poco o nessun rimodellamento.

PROTEINE SECRETE, ACIDE E RICCHE DI CISTEINA (SPARC). La proteina secreta, acida e ricca di cisteina (SPARC), è una proteina della membrana basale (BM-40) nota anche come osteonectina. Questa molecola onnipresente si trova in punti distinti nei numerosi tessuti in cui si trova. La molecola è composta da 300 aminoacidi, oltre a un peptide di segnale composto da 17 aminoacidi. Tre domini formano la molecola: un dominio acido legante Ca^{2+} , un dominio simile alla follistatina e un dominio extracellulare che lega il calcio (Goldberg et al., 2008).

Essendo una proteina legante il Ca^{2+} e una proteina legante il collagene, SPARC può contribuire indirettamente alla mineralizzazione della dentina, ma questo non è ancora stato confermato.

Ca^{++} - PROTEINE LEGANTI E METALLO-ENZIMI. La calmodulina e alcuni membri della famiglia delle annessine sono presenti sia negli odontoblasti che nella formazione della dentina (Wu et al., 2002). Complessivamente queste molecole possono essere implicate nel trasporto di Ca^{++} verso la matrice extracellulare e le fosfoproteine in esse contenute, il ruolo di queste proteine in questo meccanismo non è stato dimostrato.

Altre proteine leganti Ca^{++} possono anche svolgere un ruolo nella dentinogenesi; questo è stato suggerito nel caso della nucleobindina, una proteina legante Ca^{2+} trovata negli odontoblasti (nucleo, RER, mitocondri) e all'interno dell'ECM dentina circostante. Può contribuire all'accumulo e al trasporto di ioni Ca^{2+} sul fronte della mineralizzazione (Midura et al., 2007).

Enzimi come fosfatasi alcalina, un enzima contenente Zn e Mg e proteine leganti il catione derivati dal siero del sangue e altre molecole

elencate nella Tabella 3 sono stati identificati negli estratti di dentina. L'attività non specifica della fosfatasi alcalina tissutale (TNAP) sembra essere cruciale nella defosforilazione di alcune proteine dell'ECM. Questo enzima idrolizza il pirofosfato e fornisce fosfato inorganico per favorire la mineralizzazione (Pentikainen et al. 1997). Anche altri enzimi svolgono un ruolo nell'odontogenesi. Gli effetti indiretti dell'inibizione di MMP-2, MMP-9 e MMP-3 sono documentati. I due ex enzimi si trovano nella dentina, principalmente nella giunzione dentino-smalto. Quest'ultimo è presente nella predentina e svolge un ruolo nella regolazione del proteoglicano (Hall et al. 1999).

1.4 GROW FACTOR DI DERIVAZIONE DENTINALE

I fattori di crescita sono delle proteine capaci di stimolare la proliferazione, il differenziamento cellulare e di prevenire l'apoptosi. Sono tipiche molecole segnale usate per la comunicazione tra le cellule di un organismo; ad esempio le citochine (molecole infiammatorie) o ormoni che si legano a specifici recettori sulla membrana cellulare dei loro target.

Nella matrice extracellulare della dentina umana i principali fattori di crescita sono:

- **TGF- β 1** (fattore di crescita trasformante beta 1);
- **VEGF** (fattore di crescita dell'endotelio vascolare);
- **FGF-2** (fattore di crescita dei fibroblasti);
- **PDGF** (fattore di crescita derivato dalle piastrine);
- **IGF-1, -2** (fattore di crescita insulino-simile);
- **EGF** (fattore di crescita dell'epidermide);
- **BMP-2, -4, -7** (proteine morfogenetiche dell'osso).

Il più abbondante è il TGF- β 1 che può essere trovato sia in forma attiva che associato alla proteina di latenza (LAP), al biglicano o alla decorina (Smith et al. 1998; Sloan et al., 2002). Questo elemento sembra essere responsabile della produzione di dentina di riparazione e della regolazione dei processi infiammatori della polpa, fungendo da molecola anti-infiammatoria in

antagonismo con l'espressione cellulare dei recettori toll-like (TRL) (Mazzoni et al. 2009).

VEGF, FGF-2, PDGF e EGF sono tutti promotori dell'angiogenesi, sia in modo diretto, agendo sulle cellule endoteliali, che indiretto, come promotori della produzione di altri fattori di crescita (Mazzoni et al. 2009).

La dentina contiene inoltre le proteine morfogenetiche dell'osso (BMP), glicoproteine che fanno parte della superfamiglia dei TGF- β , le quali svolgono un ruolo fondamentale nel mantenimento dell'omeostasi tissutale (Carreira et al. 2015).

In particolare, sono stati identificati tre tipi di BMP: 2, 4 e 7:

- **BMP-2** promuove la differenziazione delle cellule staminali della polpa in odontoblasti, stimolandoli a produrre dentina (Iohara et al. 2004);
- **BMP-4**, agisce stimolando la differenziazione delle cellule staminali determinando la sovraespressione della nestina (About et al. 2000);
- **BMP-7** sembra invece essere maggiormente coinvolta nei processi di mineralizzazione delle cellule staminali del dente (Suzuki et al. 2011).

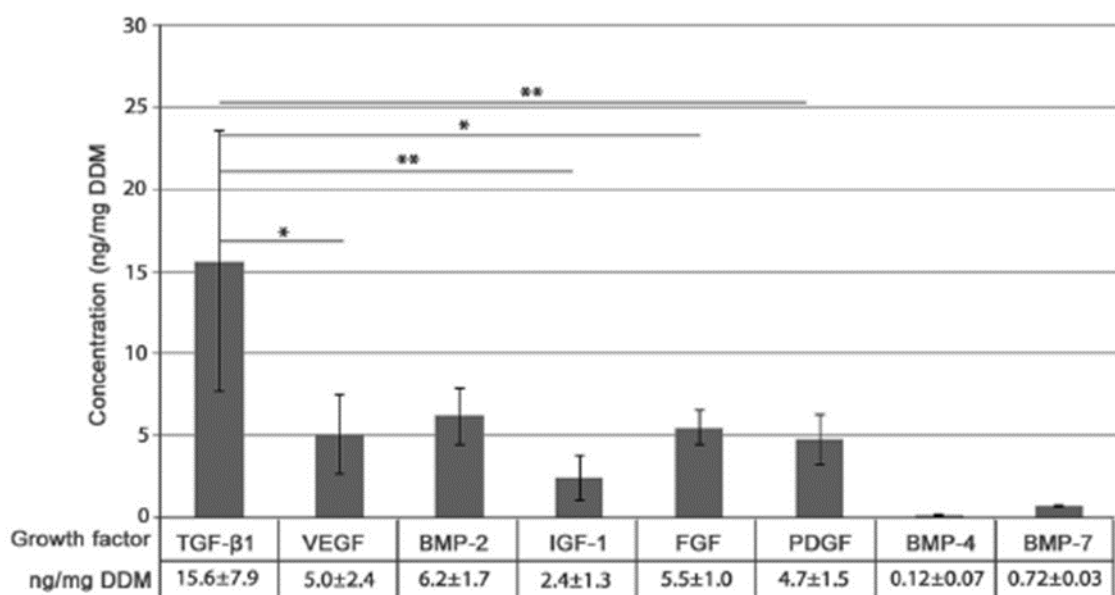


Figura 6. *Concentrazione dei fattori di crescita della dentina (Avery et al. 2017).*

Il grafico mostra le concentrazioni dei diversi fattori di crescita tramite saggio ELISA, dopo demineralizzazione con EDTA: il TGF β -1 presente in maggiore quantità, con livelli più del doppio rispetto agli altri, seguito da BMP-2, FGF, VEGF, PDGF e IGF-1.

Durante la produzione della matrice extracellulare e la successiva mineralizzazione, i fattori di crescita rimangono intrappolati nel tessuto. Tuttavia, è stato dimostrato come questi si conservino inalterati nel tempo, proprio grazie alla protezione offerta dall'idrossiapatite, anche a distanza di migliaia di anni e come sia possibile solubilizzarli e renderli di nuovo disponibili.

In particolare, sono stati solubilizzati, dalla dentina di individui del periodo neolitico e medievale, i fattori di crescita IGF-2, TGF- β e BMP-2, comparandoli con dentina proveniente da denti da poco estratti. Dalle analisi effettuate è emersa la perfetta conservazione degli stessi (Schmidt-Schultz et al., 2005).

2. TESSUTO OSSEO

Il tessuto osseo è una specializzazione del tessuto connettivo caratterizzata dalla mineralizzazione della matrice extracellulare. Le cellule si trovano dunque all'interno di una matrice extracellulare costituita da una componente minerale. L'osso è un tessuto notevolmente rigido ma non quello più duro presente all'interno del nostro organismo perché la dentina e lo smalto sono molto più mineralizzati dell'osso. Lo smalto ha una mineralizzazione della matrice extracellulare di circa il 95%, la dentina dell'85% mentre l'osso intorno al 60-70%.

Oltre ad essere molto resistente e rigido, il tessuto osseo ha una struttura nel suo complesso notevolmente leggera. Nonostante abbia doti di resistenza meccanica molto elevate è molto leggero e questo ci consente una serie di movimenti.

Altra caratteristica fondamentale è quella che l'osso non è un tessuto statico (come realtà non è un tessuto statico nessuno di quelli che possediamo) ma

forse l'osso quello più dinamico perché il principale deposito di calcio e fosforo all'interno del nostro organismo. Il calcio è uno ione che viene utilizzato in grande parte nei meccanismi di contrazione muscolare, di coagulazione e quindi, essendo molto utilizzato, c'è una continua mobilitazione di ione calcio dal tessuto osseo verso il sangue e dal sangue verso il tessuto osseo a seconda delle diverse esigenze del nostro organismo.

2.1 CRESCITA E SVILUPPO

Durante l'embriogenesi, lo scheletro si forma attraverso il processo di ossificazione diretta o indiretta. Nel caso della mandibola, della mascella, del cranio e della clavicola, le cellule progenitrici mesenchimali si condensano e si differenziano in osteoblasti, un processo conosciuto come osteogenesi intramembranosa.

In contrasto a questo, nel condilo mandibolare, le ossa lunghe e le vertebre si formano inizialmente attraverso una matrice di cartilagine, che gradualmente viene sostituita dall'osso. La formazione ossea, dipende dalla cartilagine, e il processo di crescita è conosciuto come osteogenesi endocondrale (Ranly 2000).

FORMAZIONE OSSEA INTRAMEMBRANOSA (DIRETTA):

Durante l'osteogenesi intramembranosa, si sviluppa un centro di ossificazione attraverso la condensazione mesenchimale. Con lo sviluppo e la maturazione della matrice extracellulare, la quale è ricca di collagene, le cellule osteoprogenitrici vanno incontro a ulteriore differenziamento osteoblastico. Sulle superfici del centro di ossificazione si forma un periostio fibroso sopra lo strato di osteoblasti. Mentre i nuovi osteoblasti si formano dal lato inferiore del periostio, avviene la crescita apposizionale. Una sottopopolazione di osteoblasti viene inglobata nella matrice che si sta mineralizzando e porta alla formazione di una rete lacuno-canalicolare osteocitaria. All'interno del complesso cranio-facciale, la maggior parte delle ossa si sviluppa e cresce secondo questo meccanismo.

Nella mandibola l'ossificazione diretta prende il nome di ossificazione mantellare: qui la cartilagine produce fattori di crescita che vengono

percepiti dal connettivo circostante, il che dà luogo alla formazione degli osteoblasti che daranno vita al nuovo tessuto osseo.

CRESCITA OSSEA ENDOCONDRIALE (INDIRETTA): Durante l'osteogenesi endocondriale, le ossa si sviluppano attraverso la formazione di una matrice cartilaginea (modella di cartilagine ialina) che si mineralizza, viene in seguito riassorbita dall'azione degli osteoclasti e sostituita dall'osso che viene successivamente depositato. Questo processo ha inizio durante il terzo mese di gestazione. Il processo di crescita ossea endocondrale porta alla formazione dei centri di ossificazione primari e secondari, che sono separati da una struttura cartilaginea conosciuta come cartilagine di accrescimento. A seguito della formazione del centro di ossificazione primario, la crescita ossea si estende dal centro dell'asse diafisario verso entrambe le estremità dell'osso. Le cellule cartilaginee, presenti sui margini dell'ossificazione, vanno incontro a morte. Gli osteoblasti ricoprono le trabecole cartilaginee con osso spugnoso immaturo (woven bone). Dietro il fronte di ossificazione che avanza, gli osteoclasti assorbono l'osso spugnoso e ingrandiscono la cavità midollare primaria. Il collare periostale si ispessisce e si estende verso le epifisi per compensare il continuo svuotamento della cavità primaria.

2.2 ORGANIZZAZIONE E STRUTTURA

Il tessuto osseo è un tessuto connettivo specializzato costituito da elementi organici e inorganici che va incontro a mineralizzazione ed è popolato da cellule altamente specializzate che regolano la sua stabilità.

L'unità di base del tessuto osseo maturo è l'osteone (o sistema Haversiano), il quale è costituito da un canale centrale (canale di Havers), contenente vasi e fibre nervose, circondato da lamelle concentriche che si dispongono a formare unità cilindriche. All'interno di ogni lamella le fibre collagene sono disposte in maniera parallela e assumono direzioni opposte rispetto alle lamelle adiacenti, conferendo all'osteone notevole resistenza alle sollecitazioni meccaniche.

provenienti da diverse direzioni.

I canali Haversiani sono in comunicazione tra loro attraverso canali perforanti di Volkmann, che permettono anche a vasi e nervi provenienti dal periostio o dall'endostio di raggiungere i diversi osteoni.

Tra gli osteoni vi sono infine le lamelle interstiziali, residui di vecchi osteoni andati incontro a riassorbimento durante i fisiologici meccanismi di rimodellamento osseo che proseguono per tutta la vita (Ross et Pawlina, 2010; Lang et Lindhe, 2016).

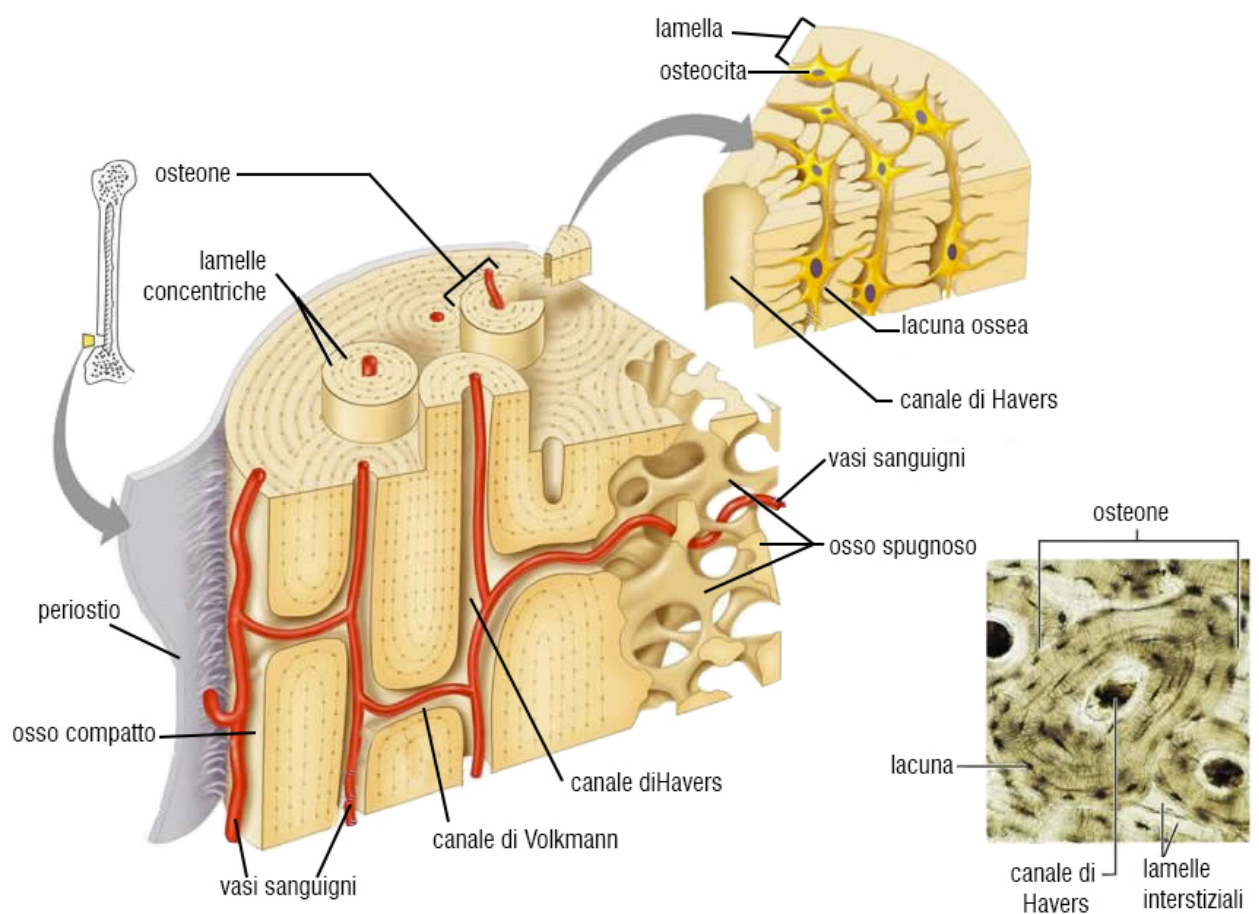


Figura 7. *Struttura del tessuto osseo.*

Il differenziamento e lo sviluppo del tessuto osseo dipendono dal rilascio di fattori di crescita: il fattore di crescita insulino-simile (**IGF**), il fattore di crescita trasformante- (**TGF-**), il fattore di crescita derivato dalle piastrine (**PDGF**) e le proteine morfogenetiche dell'osso (**BMP**).

Il tessuto osseo è costituito da cellule, da una matrice intercellulare organica e da una matrice intercellulare inorganica (o minerale).

MATRICE ORGANICA

La matrice organica dell'osso costituisce circa il 30-35% del peso osseo totale ed è formata per il 90% da **collagene di tipo I** e per il 10% da proteine non collagene:

- **Proteoglicani:** composti da glicosaminoglicani acidi, solitamente solforati, uniti assieme da brevi catene proteiche. Quelli meglio conosciuti sono:
 - Proteoglicano di tipo I (PG-I), detto anche biglicano in quanto costituito da due molecole di condroitinsolfato unite ad una estremità da un polipeptide ricco di leucina; lo si ritrova sia nella sostanza intercellulare mineralizzata che in quella non mineralizzata adiacente alle cellule ossee e ai loro prolungamenti, il cosiddetto tessuto osteoide;
 - Proteoglicano di tipo II (PG-II), detto anche decorina in quanto tende ad associarsi alle microfibrille collagene come a decorarle. È formato da una parte proteica analoga a quella del PG-I unita ad una sola molecola di condroitinsolfato. Lo si ritrova nella sostanza intercellulare mineralizzata ma non nel tessuto osteoide, per cui si ipotizza che abbia un ruolo nell'orientare la deposizione dei cristalli minerali lungo le microfibrille collagene.
- **Glicoproteine:** di solito fosforilate o solfatate, includono molecole diverse alcune delle quali sono ritenute giocare un ruolo fondamentale nel controllo dei processi di mineralizzazione. Tra queste si annoverano:
 - Osteonectina, la glicoproteina più abbondante (costituisce il 3% della matrice organica). È dotata di alta affinità per il calcio, sia come ione libero che associato in complessi di tipo cristallino. Si ritiene che essa agisca come elemento di nucleazione dei cristalli minerali, in quanto ritenuta capace di concentrare il calcio nelle sue adiacenze creando

così le condizioni per avviare la precipitazione del fosfato di calcio. Si lega al collagene e all'idrossiapatite;

- Fosfatasi alcalina, un enzima capace di idrolizzare gruppi fosfato legati a substrati organici (come il piridossal-5-fosfato) attivo in ambiente alcalino (pH 8-10). Essa potrebbe giocare un ruolo nei processi di mineralizzazione, mettendo a disposizione gli ioni fosfato per la formazione dei cristalli minerali, oppure sarebbe invece coinvolta nella sintesi della matrice organica dell'osso;
- Fibronectina. Molecola di adesione localizzata prevalentemente nella matrice pericellulare e caratterizzata da una porzione capace di legarsi al collagene. Si ritiene che la fibronectina sia coinvolta nei processi di migrazione, adesione alla matrice e organizzazione delle cellule dell'osso;
- Sialoproteine, o BSP (bone sialo-proteins) Sono glicoproteine peculiari contenenti residui glicidici di acido sialico. Queste proteine posseggono una sequenza aminoacidica particolare Arg-Gly-Asp (sequenza RGD) che media l'adesione al substrato di svariati tipi cellulari, incluse le cellule dell'osso. Si ritiene pertanto che le sialoproteine ossee abbiano la funzione fisiologica di consentire l'adesione delle cellule alla matrice ossea. Se ne conoscono più tipi: osteopontina (o BSP-I), la BSP-II e la glicoproteina acida dell'osso (o BAG-75);
- Proteine contenenti l'acido g-carbossiglutammico (GLA), un aminoacido particolare derivato dall'acido glutammico con un ulteriore gruppo carbossilico legato al carbonio in posizione γ. Il GLA incluso in una proteina possiede, nella porzione del residuo, due gruppi carbossilici liberi e ravvicinati che a pH fisiologico sono ionizzati e carichi negativamente, e pertanto capaci di agire come una sorta di chelanti per i cationi bivalenti quali lo ione calcio. Le proteine dell'osso contenenti il GLA sono di due tipi: osteocalcina (presenta un'elevata affinità di legame per l'idrossiapatite), o proteina GLA

dell'osso, una piccola proteina contenente 3-5 residui di GLA. È stato ipotizzato che essa possa giocare un ruolo di inibizione della mineralizzazione in quanto ritenuta capace di legarsi allo ione calcio e di renderlo indisponibile per la combinazione con lo ione fosfato, inibendo così l'accrescimento dimensionale dei cristalli minerali. Questa ipotesi è avvalorata dalla constatazione che l'osteocalcina abbonda nel tessuto osseo maturo ed è invece scarsa nel tessuto osseo in via di formazione, nonché dal reperto che questa proteina inibisce la crescita di cristalli di fosfato di calcio in vitro.

Proteina GLA della matrice è presente sia nell'osso maturo che in quello in via di formazione, nonché nella cartilagine destinata a essere sostituita da tessuto osseo, come la cartilagine di accrescimento. Il suo ruolo biologico non è chiarito.

MATRICE INORGANICA

La matrice inorganica (o minerale) dell'osso aumenta durante lo sviluppo e l'accrescimento raggiungendo il 65% del peso secco dell'osso. Il contenuto in Sali minerali si abbassa nel rachitismo e nell'osteomalacia. La componente minerale dell'osso è rappresentata principalmente da fosfato di calcio e da carbonato di calcio nonché da quantità minori di altri Sali. La composizione della matrice minerale varia con l'età ed in rapporto a fattori dietetici.

I Sali di calcio sono combinati con il collagene e con i proteoglicani della matrice organica. I minerali sono presenti come cristalli submicroscopici di idrossiapatite. Al microscopio elettronico i cristalli di idrossiapatite appaiono come aghi sottili, lunghi 20-40 nm e spessi 1.5-3 nm. I cristalli minerali sono distribuiti come particelle contigue lungo i fasci di fibrille collagene ma anche lungo le singole fibrille e nello spessore delle fibrille stesse con le quali si combinano. Durante la calcificazione dell'osso, i cristalli di idrossiapatite si allineano ordinatamente lungo le fibrille collagene, dapprima in rapporto al periodo di 68-70 nm e successivamente per tutta la loro estensione.

L'osso decalcificato perde la sua durezza e rigidità, diventa flessibile conservando tuttavia resistenza alla trazione, la forma macroscopica e la struttura microscopica.

Quando sono distrutti i suoi costituenti organici (fibre e cellule), mediante macerazione o calcinazione (combustione prolungata con libero accesso d'aria) che risparmia la componente minerale, l'osso conserva la forma e le dimensioni originali ma perde la resistenza alla trazione diventando fragile come porcellana. Ciò dimostra che i costituenti inorganici dell'osso sono responsabili della sua durezza e rigidità mentre la resistenza alla trazione e alla pressione legata alla matrice organica e principalmente alle fibre collagene. Le proprietà di resistenza dell'osso dipendono in larga misura dalla sua organizzazione lamellare e dalla disposizione ordinata ma con orientamento diverso delle fibre collagene nelle lamelle contigue.

CELLULE DEL TESSUTO OSSEO

Normalmente, nella formazione dell'osso, le cellule mesenchimali si differenziano in cellule osteoprogenitrici che proliferano attivamente e si trasformano in osteoblasti; questi ultimi, dopo aver depositato la sostanza ossea, si trasformano in osteociti.

Gli osteoclasti appartengono ad una linea cellulare diversa da quella degli osteoblasti ed osteociti in quanto discendono dalla cellula staminale emopoietica.

Nel periostio e nell'endostio, al termine dei processi osteoformativi, lo strato epitelioide di osteoblasti attivi si trasforma in uno strato di cellule osteoprogenitrici, quiescenti. Questo cambiamento morfologico e funzionale reversibile è definito modulazione in contrapposizione alla differenziazione che comporta una trasformazione più stabile.

Nella vita postnatale permangono nel periostio e nell'endostio cellule mesenchimali indifferenziate, pluripotenti, le quali possono differenziarsi in risposta ad appropriati stimoli (fratture, ossificazione metaplastica).

CELLULE OSTEOPROGENITRICI (PREOSTEOBLASTI).

Le cellule osteoprogenitrici (o preosteoblasti) sono elementi fusati o leggermente appiattiti e con citoplasma acidofilo o leggermente basofilo e sono difficilmente distinguibili dai comuni fibroblasti o dalle cellule mesenchimali indifferenziati. Si riscontrano sulla superficie delle trabecole ossee in via di ossificazione e nel tessuto connettivo delle cavità midollari dell'osso; formano uno strato continuo (strato preosteoblastico) alla superficie interna del periostio e nell'endostio; rivestono i canali di Havers e di Volkmann.

Le cellule osteoprogenitrici derivano dalla cellula mesenchimale e costituiscono una popolazione di elementi relativamente indifferenziati e proliferanti. Esse hanno i caratteri di cellule staminali, di elementi cioè dotati della capacità di dare origine mediante frequenti mitosi a cellule destinate a differenziarsi nonché ad altre cellule osteoprogenitrici.

Durante l'accrescimento dell'osso le cellule osteoprogenitrici proliferano attivamente e si trasformano nelle cellule osteogeniche, od osteoblasti.

Gli stessi fenomeni di attivazione delle cellule osteoprogenitrici si verificano nell'individuo adulto, durante la riorganizzazione interna dell'osso e nel corso di riparazione di fratture. La trasformazione di preosteoblasti in osteoblasti attivi soprattutto manifesta nel periostio e nell'endostio dove lo strato di preosteoblasti fusati od appiattiti si trasforma in uno strato osteoblastico di elementi cuboidi con disposizione epitelioidale.

OSTEOBLASTI.

Gli osteoblasti partecipano direttamente alla formazione del tessuto osseo, secernendo i componenti organici della matrice (collagene, proteoglicani e glicoproteine) e regolando anche la deposizione di sali minerali. Si riscontrano soprattutto in corrispondenza delle superfici in via di espansione delle ossa e nello strato osteogenico del periostio e dell'endostio durante tutto il periodo di morfogenesi dell'osso. In tali sedi, durante la fase attiva di sintesi della sostanza ossea, gli osteoblasti sono disposti a formare uno strato epitelioidale. Sono cellule piuttosto grandi. Nella parte della cellula rivolta verso la matrice in via di

mineralizzazione si riscontrano numerose vescicole con contenuto amorfo o granulare. Queste vescicole a contenuto glicoproteico e proteoglicanico sono probabilmente espulse dalla cellula nella matrice dove funzionerebbero come “nuclei” per l’inizio della sua mineralizzazione. Quando la neoformazione di tessuto osseo si arresta, scompaiono i granuli, la reazione per la fosfatasi alcalina e la basofilia citoplasmatica si attenuano e gradualmente gli osteoblasti si trasformano in osteociti.

In corrispondenza del periostio e dell’endostio, invece, assumono forma fusata permanendo come cellule osteogeniche quiescenti o cellule osteoprogenitrici.

OSTEOCITI.

Gli osteociti sono cellule di forma stellata che si trovano all’interno di spazi chiamati lacune, nella matrice ossea mineralizzata.

Possiedono dei prolungamenti citoplasmatici, conosciuti come dendriti, che si estendono in canalicoli all’intero del tessuto grazie ai quali queste cellule prendono contatto con altri osteociti e cellule di rivestimento. Possono inoltre comunicare in maniera indiretta con cellule poste a distanza, come gli osteoblasti, i periciti e altre cellule dell’osso mediante la secrezione di molecole segnale.

Si viene così a formare una rete di comunicazione, grazie alla quale gli osteociti possono rispondere a stimoli meccanici e orchestrare gli eventi di apposizione e riassorbimento osseo.

Sono dunque cellule molto importanti per il tessuto osseo, in quanto fungono da meccanocettori e risultano essere fondamentali nel mantenimento dell’omeostasi del tessuto.

OSTEOCLASTI.

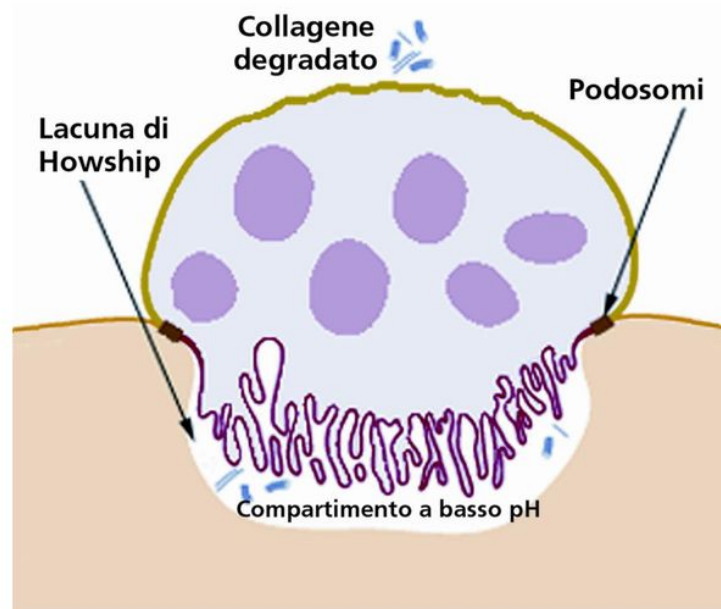
Gli osteoclasti sono cellule giganti plurinucleate, del diametro di 20-100 μ m, contenenti decine di nuclei, che si trovano sulla superficie di trabecole ossee in via di riassorbimento. Sono gli elementi cellulari deputati a distruggere l’osso.

Appaiono spesso accolti in fossette scavate sulla superficie della trabecola ossea, definite fossette o lacune di Howship, che si formano proprio per azione erosiva degli osteoclasti.

L'azione erosiva degli osteoclasti sulla matrice organica ed inorganica si esercita mediante:

1. L'adesione alla matrice da erodere avviene attraverso recettori integrinici ed è seguita dalla comparsa di podosomi, strutture di adesione che permettono di isolare l'ambiente in cui avverrà il riassorbimento. L'osteoclasto si affaccia sulla matrice da riassorbire dal lato dell'orletto striato.
2. Una anidrase carbonica trasforma anidride carbonica e acqua in ione bicarbonato e protoni. Lo ione bicarbonato viene scambiato con Cloro. Cloro e protone vengono portati nello spazio delimitato dall'anello del podosoma.
3. Una pompa protonica situata nella membrana dell'orletto striato acidifica lo spazio extracellulare delimitato dall'anello di podosomi, si viene così a creare un pH di 4.5 che solubilizza i sali minerali.
4. A questo punto la matrice organica è libera e avviene la degradazione enzimatica, tramite il rilascio di enzimi lisosomiali. I prodotti della degradazione della matrice organica vengono endocitati e poi riesocitati dalla parte opposta della cellula (transcitosi).

Gli osteoclasti derivano dalla cellula staminale emopoietica e il loro precursore immediato appartiene alla linea monocito-macrofagica. Più precisamente, gli osteoclasti appartengono alla famiglia dei macrofagi. Gli osteoclasti hanno organelli e per il calcio



ionucleate
agi hanno
o recettori

Figura 8. *Struttura di un osteoblasto.*

TESSUTO PERIOSTALE

Il periostio è la membrana connettivale fibro-elastica, riccamente vascolarizzata, che aderisce tenacemente alla superficie esterna delle ossa. Tale lamina è assente a livello delle superfici articolari e nelle zone di inserzione dei tendini e dei legamenti.

Lo strato profondo mostra considerevoli variazioni a seconda dello stato funzionale dell'osso; durante lo sviluppo fetale e postnatale e nel corso di processi riparativi di fratture, si riscontra sulla superficie interna, al limite col tessuto osseo, uno strato epitelioide continuo di osteoblasti in attiva proliferazione e con proprietà osteogeniche (strato osteogeno di Ollier o strato cambiale). Nell'adulto, gli osteoblasti perdono le loro caratteristiche citologiche, assumono forma fusata e risultano indistinguibili dai fibroblasti circostanti; lo stato di quiescenza degli osteoblasti non è definitivo perché in caso di lesioni le cellule riacquistano la loro potenzialità osteoformativa,

assumono di nuovo i caratteri di osteoblasti ed elaborano sostanza ossea. Questi elementi con funzioni osteogeniche potenziali che residuano nel tessuto adulto sono definiti osteoblasti quiescenti o preosteoblasti o cellule osteoprogenitrici. I vasi sanguigni dello strato esterno del periostio attraversano lo strato profondo, penetrano nei canali di Volkmann e Fibre di Sharpey quindi in quelli di Havers risolvendosi in una ricca rete capillare. Grossi fasci di fibre collagene (e, in piccola misura, anche elastiche), derivanti dallo strato esterno del periostio, penetrano perpendicolarmente od obliquamente nelle lamelle del sistema circonferenziale esterno e dei sistemi interstiziali più esterni, ancorando il periostio all'osso; sono denominati fibre di Sharpey o fibre perforanti. Esse sono costituite da fasci collageni o fibroelastici con matrice non calcificata o soltanto parzialmente calcificata.



Figura 9. *Disegno che illustra le fibre perforanti di Sharpey che dal periostio si approfondano nell'osso.*

Le fibre di Sharpey contribuiscono, insieme ai vasi sanguigni perforanti, ad ancorare saldamente il periostio al sottostante osso e sono parzialmente in continuità con i tendini ed i legamenti a livello della loro inserzione sull'osso. Le fibre di Sharpey sono numerosissime nella guaina periodontale a livello della radice del dente; esse penetrano da un lato nel cemento, dall'altro

nell'osso alveolare, assicurando la fissità del dente.

ENDOSTIO

L'endostio è una sottile lamina di cellule pavimentose che riveste le cavità midollari (sia nelle diafisi delle ossa lunghe sia nell'osso spugnoso) nonché tutte le altre cavità dell'osso (canali di Havers e di Volkmann). È formato da un singolo strato di cellule che durante lo sviluppo e la crescita sono osteoblasti attivi con funzione osteoformativa e si trasformano in osteoblasti quiescenti o cellule osteoprogenitrici con potenzialità osteogeniche nell'adulto.

MIDOLLO OSSEO

Contenuto nelle cavità midollari delle ossa, il midollo osseo (o tessuto mieloide) è il principale organo emopoietico) nella seconda metà dello sviluppo fetale e durante la vita postnatale; inoltre ha:

- Funzioni osteogeniche, in quanto contiene osteoblasti ed osteoclasti nonché fornisce i vasi sanguigni all'osso in formazione;
- Funzione emocateretica (o emoclasica), in quanto svolge un ruolo importante nella distruzione delle cellule ematiche invecchiate o danneggiate ad opera dei macrofagi del sistema reticolo-istiocitario;
- Funzioni immunologiche, in quanto, indirettamente, partecipa alle reazioni immunitarie dato che fornisce al timo le cellule staminali che in questo organo si differenziano in linfociti T. Inoltre, produce monociti e macrofagi nonché linfociti B. Il midollo osseo, pertanto, è un organo linfoide primario (o centrale) e nell'adulto è il solo organo in grado di produrre l'intera gamma di elementi figurati presenti in circolo: eritrociti, leucociti (linfociti, granulociti, monociti) e piastrine;
- Infine, partecipa alle funzioni generali del tessuto connettivo.

Il midollo osseo origina nel secondo mese di vita intrauterina nella clavicola, il primo osso che si ossifica, e si estende successivamente agli altri segmenti scheletrici. Occupa tutte le cavità interne delle ossa e cioè la diafisi delle ossa lunghe e le cellette della sostanza spugnosa nelle epifisi delle ossa lunghe, piatte e brevi.

Nel feto, il midollo della maggior parte delle ossa ha funzioni emopoietiche ed detto midollo rosso per il colore rosso derivante dal gran numero di cellule della serie eritrocitaria in esso presente.

Durante il periodo di accrescimento la maggior parte del midollo, nella diafisi delle ossa lunghe e in alcuni territori spugnosi epifisari e di ossa brevi e piatte, perde le proprietà ematopoietiche diventando midollo giallo prima, nel quale il tipo cellulare preponderante è rappresentato da cellule adipose, e midollo gelatinoso poi.

Nell'adulto il midollo osseo funzionante è limitato alla diafisi delle ossa della volta cranica, alle coste, allo sterno, ai corpi vertebrali e all'osso spugnoso di alcune ossa corte e delle estremità prossimali del femore e dell'omero.

2.3 FUNZIONE

Le principali funzioni dell'osso sono di fornire locomozione, protezione agli organi e omeostasi minerale. L'equilibrio tra il riassorbimento osseo e la deposizione è influenzato dalla tensione meccanica, dai fattori ambientali locali e dagli ormoni sistemici. Le proprietà meccanica distintive dell'osso contribuiscono alla sua resistenza e capacità di consentire il movimento. Infine, una intricata serie di interazione tra cellula, matrice e molecole segnale mantengono l'omeostasi del calcio e del fosfato all'interno del corpo, che contribuisce alla resistenza meccanica.

PROPRIETÀ MECCANICHE

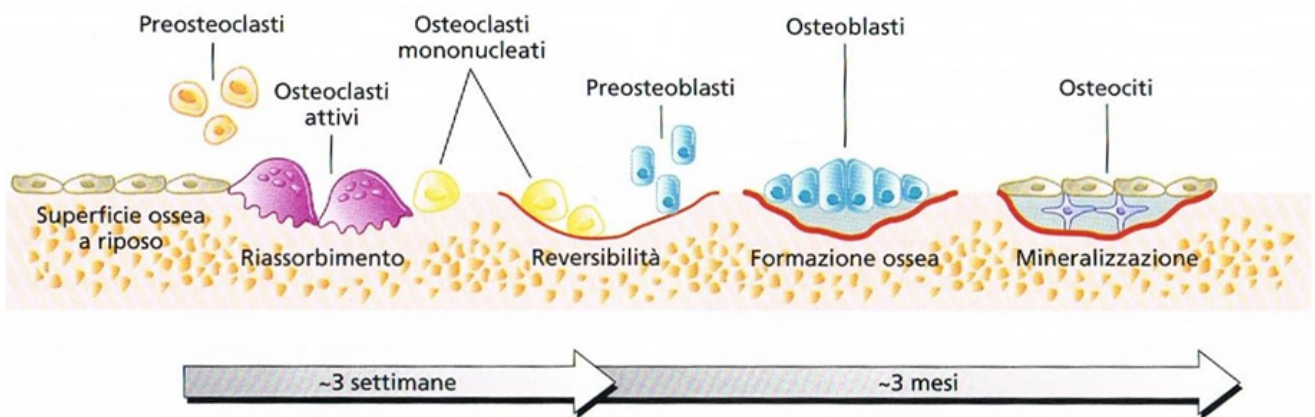
Il tessuto osseo è un tessuto altamente dinamico, in grado di adattarsi in base ai bisogni fisiologici: le sue proprietà meccaniche e metaboliche sono influenzate da fattori ambientali locali, ormoni sistemici e tensione meccanica (Burr et al., 1985, Lerner 2006).

Come accennato in precedenza, la porzione inorganica dell'osso è formata da cristalli di idrossiapatite, contenenti il calcio e il fosfato, che regolano la rigidità e l'elasticità del tessuto, nonché la sua resistenza alla trazione.

Il meccanismo di adattamento scheletrico consta principalmente in processi di riassorbimento e di apposizione ossea, che prendono il nome di rimodellamento

e, generalmente, si trovano in equilibrio tra loro mantenendo il volume osseo costante.

A seguito del riassorbimento osseo a opera degli osteoclasti, il nuovo osso viene



depositato dall'azione degli osteoblasti (Raisz 2005).

Figura 10. *Meccanismo di rimodellamento osseo (Lang et Lindhe 2016).*

In generale, il tessuto osseo risponde a schemi di carico aumentando la sintesi e modificando la composizione, organizzazione, e proprietà meccaniche (Hadjidakis e Androulakis 2006). Le evidenze indicano che lo stesso vale per l'osso in riparazione. Quando l'osso sperimenta un carico meccanico, i meccanocettori sono direttamente stimolati, il che dà inizio al processo di turnover osseo per generare e riparare l'osso nell'aria. Inoltre, la pressione aumenta l'espressione di M-CSF, aumentando il differenziamento osteoclastico nel midollo osseo (Schepetkin 1997).

Gli osteoclasti sono anche indirettamente stimolati dagli osteoblasti e condrociti che secernono prostaglandine in risposta alla pressione meccanica. La matrice extracellulare può anche promuovere il turnover osseo attraverso la trasmissione dei segnali. La resistenza ossea è determinata dalla combinazione di qualità, quantità e tasso di turnover osseo. È ben stabilito che una perdita di densità, o di qualità ossea, diminuisce la resistenza ossea e determina un aumento dell'incidenza di fratture. Tuttavia, diverse condizioni patologiche caratterizzate da un aumento della densità ossea sono anche associate ad una riduzione della resistenza ossea e un aumento dell'incidenza delle fratture; di conseguenza la qualità dell'osso è un importante fattore nel determinare la

resistenza ossea.

PROPIETA' METABOLICHE

In molti processi fisiologici l'omeostasi del calcio è di grande importanza per il mantenimento della salute (Bonewald 2002, Harkness e Bonny 2005). Il meccanismo di deposito del calcio da parte degli osteoblasti include il trasporto di fosfato e di calcio con l'alcalinizzazione per assorbire gli acidi prodotti con la deposizione della matrice; la mineralizzazione della cartilagine con il calcio avviene per diffusione passiva e produzione di fosfato. La mobilizzazione del calcio, a opera degli osteoclasti, è mediata dalla secrezione acida. Sia le cellule che formano osso che quelle che lo riassorbono usano i segnali del calcio come regolatori del differenziamento e dell'attività (Sims e Gooi 2008).

Il calcio è ottenuto dalla dieta e l'osso è un organo regolatorio chiave per l'omeostasi del calcio. L'osso risponde ai segnali calcio-dipendenti provenienti dalle ghiandole paratiroidi e dai metaboliti della via della vitamina D, tuttavia può direttamente rispondere al calcio extracellulare nel caso in cui la regolazione paratiroidea venga persa. Si raggiunge l'omeostasi del calcio sierico attraverso un complesso processo regolatorio, per cui un equilibrio tra riassorbimento, assorbimento e secrezione ossea nell'intestino e il riassorbimento e la secrezione da parte dei reni è finemente regolata dagli ormoni osteotropici (Schepetkin 1997). L'equilibrio della concentrazione sanguigna del calcio sierico ionizzato è determinato da una complessa interazione tra l'ormone paratiroideo (PTH), la vitamina D e la calcitonina. Gli altri ormoni osteotropici endocrini che influenzano il metabolismo osseo includono gli ormoni tiroidei, gli ormoni sessuali e l'acido retinoico. Inoltre il fattore di crescita dei fibroblasti aiuta l'omeostasi del fosfato. La vitamina D è coinvolta nell'assorbimento del calcio, mentre il PTH stimola il rilascio del calcio dal tessuto osseo, riduce il suo rilascio da parte del rene e aiuta la conversione della vitamina D nella sua forma biologicamente attiva (1,25-diidrossicolecalciferolo) (Holik 2007). Una riduzione dell'assunzione del calcio e della vitamina D e un deficit di estrogeni potrebbe contribuire anche a un

deficit di calcio (Lips et al. 2006).

I fattori ormonali come gli ormoni retinoidi, tiroidei e steroidi sono in grado di passare attraverso membrane biologiche e di interagire con i recettori intracellulari per avere un maggior impatto sul tasso di riassorbimento osseo. La carenza di estrogeni causa un aumento del riassorbimento osseo così come una riduzione della formazione del nuovo osso (Harkness e Bonny 2005). In aggiunta agli estrogeni, il metabolismo del calcio gioca un ruolo significativo nel turnover osseo, e la carenza di calcio e vitamina D causa una compromessa deposizione ossea.

L'ormone circolante PTH regola il calcio sierico ed è rilasciato in caso di ipocalcemie. Il PTH si lega ai recettori degli osteoblasti. Aumentando l'espressione di RANKL e il legame di questo con RANKL espresso dagli osteoclasti (McCauley e Nohutcu 2002). Questo segnale stimola il rimodellamento osseo attivando gli osteoclasti con lo scopo finale di promuovere il rilascio di calcio dall'osso. Quando somministrato terapeuticamente in dosi basse e intermittenti, il PTH può agire come agente anabolico per promuovere la formazione ossea, sebbene il meccanismo di tale azione non sia stato ben capito.

Le cellule T producono la calcitonina, un peptide di 32 amminoacidi il cui ruolo fisiologico principale è la soppressione del riassorbimento osseo. I recettori della calcitonina sono presenti in alto numero sugli osteoclasti e sui loro precursori (Schepetkin 1997). Perciò, la calcitonina è in grado di agire direttamente sulle cellule osteoclastiche in tutte le fasi del loro sviluppo per ridurre il riassorbimento osseo prevenendo la fusione dei preosteoclasti mononucleati, inibendo il differenziamento e prevenendo il riassorbimento da parte di osteoclasti maturi (McCauley e Nohutcu 2002).

2.4 PRINCIPI DI GUARIGIONE

Da un punto di vista istologico, i tipi di guarigione di un tessuto danneggiato possono essere:

Riparazione: guarigione di una ferita da parte di un tessuto, che non ripristina completamente l'architettura o la funzione della parte. A seguito di un danno a carico dell'osso, immediatamente inizia un complesso processo di guarigione costituito da molteplici fasi con lo scopo di facilitare la riparazione. La proliferazione tissutale e cellulare sono mediate, in fasi differenti, da vari fattori di crescita, citochine infiammatorie e molecole segnali. Sebbene sia un processo continuo, la riparazione ossea può essere suddivisa in tre fasi: infiammazione, riparazione e rimodellamento (Hadjidakis e Androulakis 2006). La fase infiammatoria ha inizio subito dopo il danno al tessuto e dura approssimativamente 2 settimane (Fazzalari 2011). Nel processo di riparazione la formazione del coagulo sanguigno rappresenta la fase iniziale. A seguire, il rilascio di citochine da parte delle cellule che hanno subito il danno richiama nell'area le cellule infiammatorie, dove i macrofagi iniziano a fagocitare il tessuto e le cellule danneggiate. Gli osteoclasti iniziano il processo di riassorbimento dell'osso danneggiato nell'area per riciclare i componenti minerali. Inoltre, le cellule della linea mieloide e mesenchimale sono richiamate per differenziarsi in osteoblasti e condroblasti. A questo punto, il rapporto RANKL-osteoprotegerina (OPG) si riduce. La fase di riparazione caratterizzata dalla formazione di un callo soffice in cui la nuova matrice ossea e cartilaginea comincia a formarsi. Osteoblasti e condroblasti producono un'impalcatura proteica per creare questo callo, il quale è lentamente mineralizzato per diventare duro. Il callo costituito da osso immaturo o a fasci intrecciati (woven bone). L'inizio della formazione dell'osso a fasci intrecciati nella cartilagine e nel periostio è principalmente mediata da una precoce up-regulation dell'interleuchina 6 (IL-6), del OPG, del fattore di crescita endoteliale vascolare (Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF) e delle BMP (Fazzalari 2011). La trasformazione del callo da soffice a duro avviene approssimativamente 6-12 settimane dopo la frattura ossea.

Nella fase finale della riparazione, conosciuta come fase di rimodellamento, la matrice ossea e la cartilagine sono rimodellate in osso maturo. L'osso a fasci intrecciati infine convertito in osso maturo lamellare attraverso il normale turnover osseo mediato dall'accoppiamento degli osteoblasti-osteoclasti. Adeguati livelli di vitamina D e di calcio sono critici per una corretta riparazione ossea e possono in parte dettare il tasso di riparazione. La durata della fase del rimodellamento dipende dal metabolismo osseo di ciascun individuo, ma di solito richiede mesi dal trauma.

Rigenerazione: guarigione che conduce a un completo recupero della morfologia e della funzione. una "restitutio ad integrum". Ci in contrasto con la riparazione tissutale la quale semplicemente sostituendo il tessuto perso con un tessuto immaturo e non consente di ripristinare completamente la funzione. Nel corso del tempo, l'osso in grado di sostenere il danno proveniente dal sollecitamento meccanico, dal sovraccarico e da altre forme di danno tissutale, che causano microfratture e altri difetti nell'architettura ossea. Per evitare un danno maggiore, l'osso va incontro a un naturale processo di rimodellamento per rigenerarsi o rinnovarsi. Ogni singolo osso ha un tasso di turnover specifico, tuttavia il tasso di turnover medio del 10% (McCauley e Nohutcu 2002). La rigenerazione del tessuto osseo coinvolge la formazione e il riassorbimento dell'osso in una unit di base multicellulare (Basic Multicellular Unit, BMU) (Sims e Gooi 2008). In questo processo, il riassorbimento osseo a opera degli osteoclasti avviene prima per un periodo di 3-4 settimane, insieme a una trasmissione del segnale cellulare per promuovere il reclutamento degli osteoblasti nell'area. Gli osteoblasti, in seguito, formano l'osso per un periodo di 3-4 mesi, con un periodo quiescente tra riassorbimento e la formazione ossea, chiamato fase di inversione. L'osso trabecolare va incontro a un turnover osseo in una percentuale significativamente superiore (rispetto a quello corticale) (McCauley e

Nohutcu 2002).

La rigenerazione ossea è un normale processo, ma in alcuni casi vi è la necessità di aumentare il tasso di rigenerazione ossea o di contrastare gli effetti di disordini patologici ossei. Le strategie terapeutiche per promuovere la rigenerazione ossea includono innesti di osso proveniente da varie fonti, membrane di separazione per escludere l'epitelio, agenti anti-riassorbimento, agenti anabolici e fattori di crescita per promuovere il differenziamento e la proliferazione degli osteoblasti.

Quando si verificano delle alterazioni nel turnover osseo, l'omeostasi scheletrica è distrutta, dando luogo a condizioni con una densità minerale ossea aumentata o diminuita (Bone Mineral Density, BMD) oppure necrosi ossea, e spesso si associa una riduzione della resistenza ossea. Un'ampia varietà di condizioni può alterare l'omeostasi dell'osso e questo includono tumori, menopausa, farmaci, condizioni genetiche, deficit nutrizionali, o infezioni. Alcune di queste eziologie, come la carenza di vitamina D, sono facilmente curabili, mentre altre, come le mutazioni genetiche, sono tipicamente trattate gestendo i sintomi. Alterazioni nell'omeostasi ossea causano una varietà di sintomi, che includono un'aumentata incidenza di fratture, dolore osseo e altre deformità scheletriche che risultano in un elevato livello di morbidità e in alcuni casi morte.

La guarigione di un tessuto può essere influenzata sia da fattori sistemici che da fattori locali.

Fattori sistemici:

- Età: la capacità di guarigione diminuisce con l'età;
- Malnutrizione: insufficiente assunzione di cibo, carenze di vitamine (soprattutto vitamina C), e altre carenze di proteine e vitamine;
- Ormoni (glucorticoidi): determinano una riduzione della reazione infiammatoria e inibiscono la crescita dei fibroblasti, la produzione di

collagene e la formazione di cellule endoteliali;

- Disordini sistemici: osteoporosi, osteomalacia, osteonecrosi, osteomelite e osteogenesi imperfetta.
- Stress;
- Iperparatiroidismo: causato da una sovrapproduzione di PTH, il quale promuove il riassorbimento del calcio e del fosforo del tessuto osseo per aumentare il livello del calcio a livello sierico.

Fattori locali:

- Presenza di microorganismi,
- Eccessiva manipolazione del tessuto durante il trattamento,
- Trauma dei tessuti,
- Presenza di corpi estranei,
- Ripetute procedure di trattamento che durante il processo di guarigione distruggono l'attività delle cellule più anziane,
- Inadeguata perfusione vascolare all'area circostante.

3. DENTINA DEMINERALIZZATA COME BIOMATERIALE

Le ricerche sulle proprietà che inducono la formazione di osso a partire dalla dentina sono iniziate nel 1967.

Dopo che Urist ha proposto che i BMP della dentina e dell'osso sono importanti stimolanti con proprietà osteoinduttive, Yeomans e Urist sono stati i primi a mostrare le proprietà rigenerative della matrice dentinale demineralizzata (DDM). La dentina demineralizzata induce una nuova formazione ossea, un lento riassorbimento minerale e un rilascio della proteina morfogenetica (rhBMP-2).

Nel 2005, Murata ha dimostrato che rhBMP-2 ha aumentato il potenziale induttivo osseo del DDM nei tessuti sottocutanei di ratto e ha suggerito che il DDM riciclato nell'uomo è una matrice unica, assorbibile e osteoconduttiva che dovrebbe essere un'impalcatura efficace per consegna BMP-2 (Murata et al.

2011).

Fondamentale il processo di demineralizzazione. Molti studi in vivo hanno indicato che il DDM è una matrice di induzione ossea più efficace della matrice di dentina calcificata (CDM). Le proprietà induttive ritardate della dentina calcificata possono essere correlate all'inibizione del rilascio di BMP da parte dei cristalli di apatite.

Al momento, DDM per la rigenerativa è disponibile in due forme, polvere e blocco. La polvere DDM viene preparata frantumando la dentina in particelle di dimensioni 300–800 μm e possiede micropori derivati dai tubuli dentinale (diametro: 1,0–3,0 μm , circa 50.000 tubuli / mm^2) (Kim et al. 2010). Questi pori, tuttavia, sono troppo piccoli per l'infiltrazione cellulare e la crescita. Invece, i tubuli dentinali e la matrice di collagene dopo la demineralizzazione possono servire da canali per il rilascio di proteine essenziali per la crescita e la differenziazione degli osteoblasti e aumentare l'assorbibilità della dentina. (Kim et al. 2014, Murata et al. 2010). Sebbene Reddi e Huggins (Reddi et al. 1973) hanno documentato l'osteoinduzione con particelle di dentina di dimensioni 74–420 μm , Togari et al. (Togari et al. 2011) hanno dimostrato che le particelle di dentina di dimensioni di 250–500 μm erano altamente efficienti nell'osteoinduzione. Di recente, Koga et al. (Koga et al. 2016) ha raccomandato l'uso di particelle da 1000 μm , a seguito di demineralizzazione parziale con HNO_3 al 2%, rispetto alla dentina non demineralizzata o completamente demineralizzata.

Diversi studi che hanno utilizzato il trapianto di blocchi di dentina umana (5–6 mm di diametro; 3 mm di spessore) per difetti dell'osso di coniglio hanno mostrato un'anchilosi dentina-ossea progressiva dopo 3 mesi, con riassorbimento osseo sostitutivo e nessun segno di infiammazione (Andersen et al 2009, Qin et al. 2014). Inoltre, l'uso di scaffold porosi per dentina supporta una rapida crescita microvascolare, nonché l'osteointegrazione, evidenziando il loro potenziale come materiali per l'ingegneria ossea (In-Woong et al. 2017).

3.1 SOMIGLIANZE CON IL TESSUTO OSSEO

L'osso e la dentina sono tessuti mineralizzati di composizione chimica quasi simile. Sono costituiti da 18% di collagene (prevalentemente di tipo 1), 2% di proteine non collagene (PCN), 70% di idrossiapatite (HA) e 10% di liquidi corporei (percentuali che indicano peso / volume). La matrice non collagenica extracellulare secreta dagli odontoblasti e dagli osteoblasti è molto simile, dal momento che molte proteine sono presenti in entrambi i tessuti, sebbene vi siano differenze quantitative.

La sialofosfoproteina dentinale è altamente espressa nella dentina e negli odontoblasti, ma non in maniera esclusiva. Si trova anche nell'osso, con un rapporto di 1:400 rispetto la dentina, e sembra svolgere un ruolo nella regolazione del turnover tissutale (Qui et al. 2003).

La proteina DMP-1 è presente in entrambi i tessuti. All'interno del tessuto osseo regola la maturazione e la funzione degli osteociti e svolge un ruolo fondamentale nel controllo della mineralizzazione (Feng et al. 2006).

La sialoproteina dell'osso (BSP) è presente in uguale quantità nei due tessuti, dove ne stimola la crescita e la mineralizzazione (Bouleftour et al. 2016).

L'osteopontina è un promotore dell'angiogenesi e modula la differenziazione degli osteoclasti (Rittling et al., 1998).

L'osteocalcina e l'osteonectina sono state localizzate in entrambi i tessuti ma con distribuzione temporale diversa: ON nelle fasi iniziali di sviluppo, mentre OC quando già è avvenuta la differenziazione (Papagerakis et al., 2002).

Ultimi elementi della matrice extracellulare in comune tra osso e dentina sono rappresentati da quei fattori di crescita che sono in grado di stimolare la proliferazione e differenziazione cellulare dei due tessuti (MacDougall et Javed., 2010) (Murata et al., 2012):

- Proteine morfogenetiche dell'osso (**BMP**);
- Dal fattore di crescita trasformante beta (**TGF-β1**);
- Dal fattore di crescita insulino-simile (**IGF**);
- Dal fattore di crescita dei fibroblasti (**FGF**).

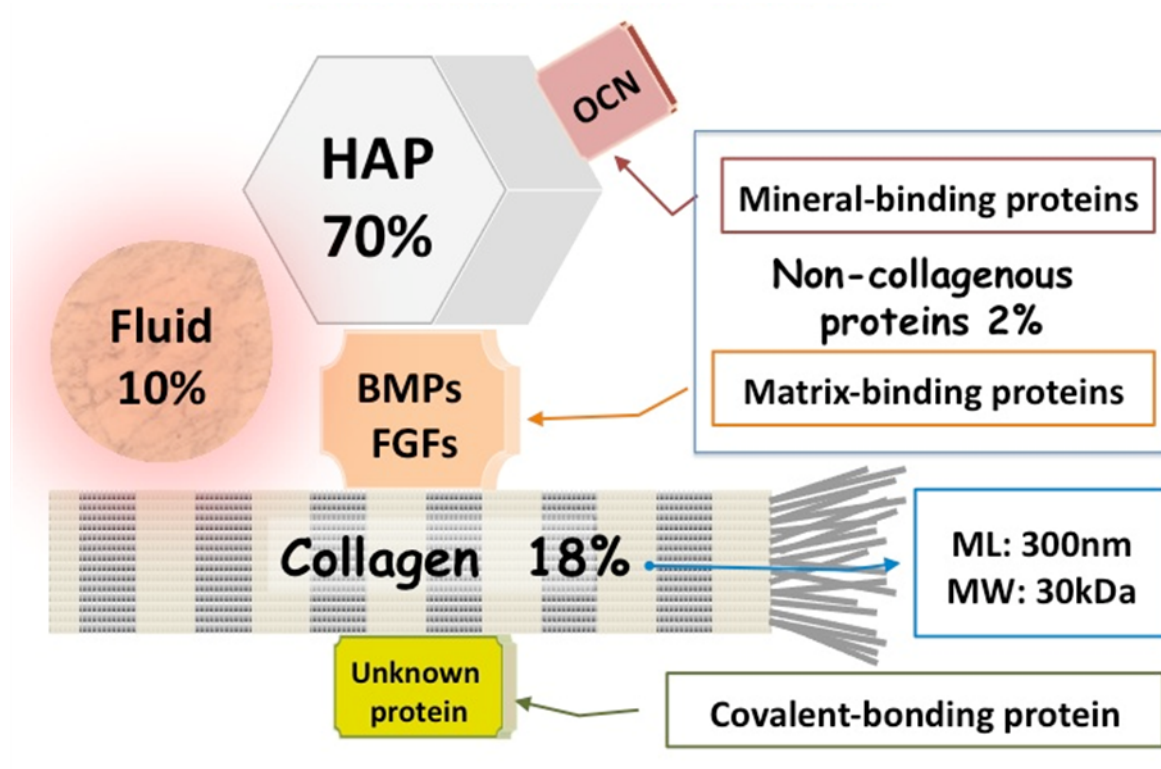


Figura 11. *Composizione chimica di osso e dentina umana in peso (Murata et al., 2012).*

4.2 L'IMPORTANZA DELLA DEMINERALIZZAZIONE

Gli studi in vivo hanno indicato che il DDM è una matrice di induzione ossea più efficace della matrice di dentina calcificata (CDM), poiché i granuli di CDM inducevano la formazione di una scarsa quantità di osso dopo un periodo di latenza di 8-12 settimane. Le proprietà induttive ritardate della dentina calcificata possono essere correlate all'inibizione del rilascio di BMP da parte dei cristalli di apatite. Nello studio di Bang e Urist del 1967 è stata impiantata nel muscolo dell'addome di ratto sia dentina demineralizzata che dentina mineralizzata, per valutare se questa potesse essere in grado di stimolare la formazione di tessuto osseo. A differenza della dentina demineralizzata che già a 4 settimane determinava apposizione ossea, si osservava osteogenesi solamente dopo 8-12 settimane. Inoltre la quantità di tessuto neoformato era piuttosto scarsa se confrontata a quella trovata a contatto con l'impianto costituito da dentina demineralizzata.

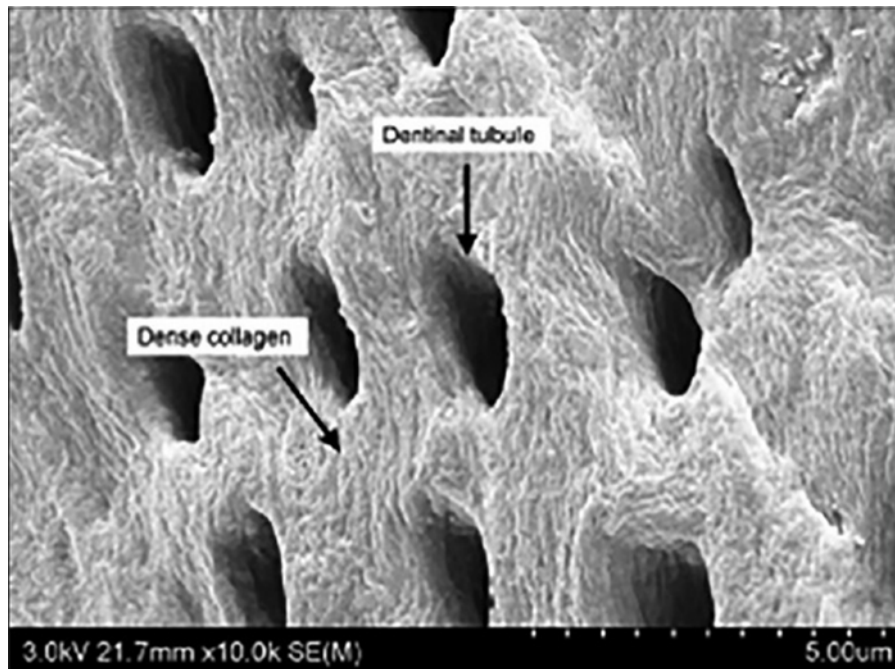


Figura 11. *Dentina demineralizzata vista al SEM.*

Durante la dentinogenesi si ha inizialmente deposizione di matrice extracellulare. All'interno di questa si trovano collagene, proteine non collageniche e fattori di crescita. Con la mineralizzazione successiva questi ultimi rimangono intrappolati nel tessuto, protetti dai cristalli di idrossiapatite, e non sono perciò più disponibili. La demineralizzazione, mediante eliminazione della componente inorganica, determina sia un'esposizione della matrice, che promuove l'adesione cellulare alla dentina, sia una solubilizzazione delle molecole bioattive contenute al suo interno, tra cui i fattori di crescita e, in particolare, le BMP. Queste modifiche all'interno della dentina la rendono capace di indurre la differenziazione delle cellule mesenchimali in osteoblasti e la produzione di tessuto osseo.

La demineralizzazione della dentina determina l'eliminazione della maggior parte della fase minerale e dei componenti immunogenici, mantenendo una frazione molto bassa di minerali e la maggior parte del collagene di tipo I e dei PCN, fornendo un'impalcatura osteoconduttiva e osteoinduttiva contenente diversi fattori di crescita. (Kim et al 2014).

Di recente è stato condotto uno studio che ha messo a confronto le capacità osteogenetiche della dentina umana demineralizzata con quelle della dentina umana non demineralizzata.

Sono stati creati difetti ossei sperimentali nella mandibola, nella calvaria e nella tibia di ratti e sono stati utilizzati come innesti i due tipi di dentina.

I risultati a 3 settimane hanno mostrato come, a contatto con la dentina demineralizzata, si avesse neoapposizione di tessuto osseo nella mandibola e nella calvaria, mentre non era possibile rilevare la presenza di nuovo osso a contatto con la dentina mineralizzata.

Nei difetti ossei creati nella tibia si è osservato un marcato riassorbimento dell'innesto di dentina demineralizzata e la presenza di cellule adese sulla superficie, mentre la dentina mineralizzata si è mostrata integra e con poche cellule adese.

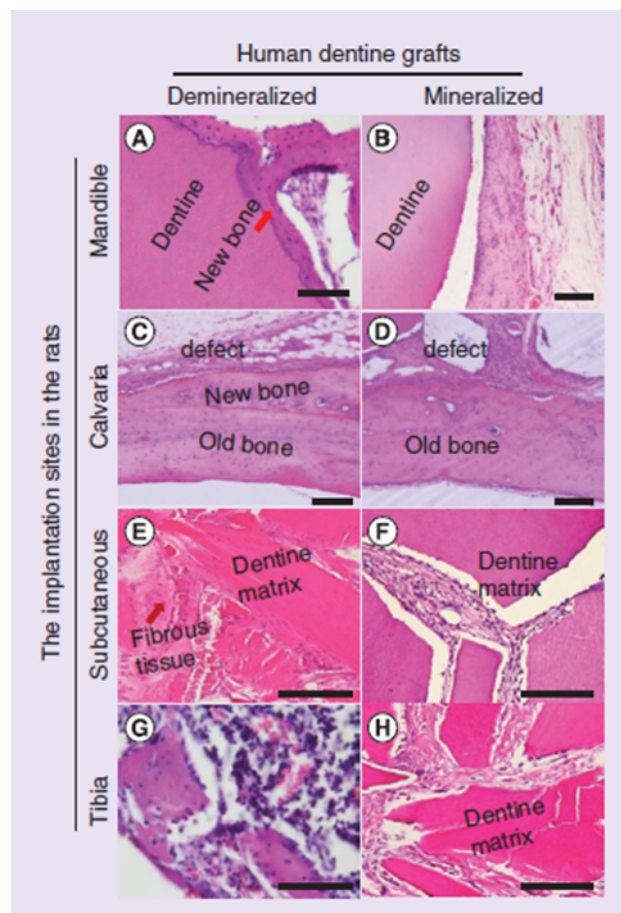


Figura 12. *Analisi istologica di innesti di dentina umana mineralizzata e demineralizzata a confronto nel ratto (Rijal et Shin, 2017).*

Il trattamento con acidi, oltre ad essere causa della demineralizzazione della dentina, cosa che la rende in grado di stimolare l'osteogenesi, si è dimostrato efficace nell'aumentare l'istocompatibilità dell'innesto grazie alla denaturazione delle proteine (Huggins et al., 1970).

OSTEOINDUTTIVITA' DELLA MATRICE DENTINALE DEMINERALIZZATA

Esiste tanta letteratura che conferma il ruolo della dentina demineralizzata come materiale osteoinduttore.

La prima ricerca che ha utilizzato dentina decalcificata, proveniente da differenti specie animali, è stata impiantata nei muscoli della parete addominale di ratti e conigli. Dalle analisi effettuate è stato possibile individuare, già a distanza di quattro settimane, la presenza di osteoblasti e di tessuto osseo neoformato, circondato da un manicotto fibroso periostale.

Si è visto che la neoapposizione di tessuto sulla matrice dentinale avveniva per la maggior parte all'interno di "camere di scavo" prodotte dalla crescita di germogli vascolari, macrofagi e cellule mesenchimali, successivamente sostituite da cellule osteoprogenitrici. L'osso neoformato, una volta deposto, veniva subito riassorbito da parte degli osteoclasti, andando incontro a un processo di rimodellamento con conseguente formazione di tessuto maturo costituito da midollo al proprio interno. Gli autori hanno dunque mostrato come la matrice dentinale collagenica, similmente a quella ossea, offra un substrato in grado di interagire con le cellule del tessuto ospite, svolgendo una azione induttiva. Il riassorbimento dell'impianto costituito da dentina porta alla creazione di "camere di scavo" che vengono occupate da cellule osteoprogenitrici, le quali iniziano la deposizione di tessuto osseo (Bang et Urist, 1967).

Gomes et al. (2001) hanno riportato che la DDM impiantata nell'osso parietale di conigli ha stimolato la formazione di nuovo osso e sono state completamente incorporate nel tessuto osseo appena formato, essendo state riassorbite durante il rimodellamento osseo.

Togari et al. (2011) hanno illustrato che nei difetti del cranio del ratto si verificata una nuova formazione ossea da singoli granuli DDM bovini all'interno del difetto e non solo dal suo margine. Hanno concluso che il DDM funge da impalcatura per la rigenerazione ossea inducendo un alto grado di nuova formazione ossea subito dopo l'intervento chirurgico.

Murata et al. (Murata et al. 2003 e 2010) hanno confermato che i granuli DDM derivati dal dente del giudizio umano hanno indotto indipendentemente la formazione di ossa e cartilagini nei tessuti sottocutanei di topi nudi.

Kim et al. (2013) hanno condotto uno studio in vivo per valutare le risposte dei tessuti al DDM umano inserito nel dorso dei topi. In 2 settimane, nuove cellule di rivestimento si erano attaccate alla polvere DDM senza alcuna infiammazione, suggerendo la sua eccellente biocompatibilità. Kim et al. (Kim et al. 2013 e 2014) hanno anche mostrato che l'innesto di DDM umano nel tessuto muscolare di topi nudi ha indotto indipendentemente la cartilagine e la formazione ossea. Il tessuto osteoide appena depositato sulla polvere di DDM ne illustra l'osteoinduttività.

Molti studi hanno provato la capacità delle BMP di stimolare la formazione di tessuto osseo e cartilagine, inducendo la differenziazione di cellule mesenchimali in cellule osteoprogenitrici o condrociti (Inoue et al. Melcher, 1986).

Recentemente sono state isolate e quantificate le BMP e i fattori di crescita della dentina ed è stata, inoltre, messa in coltura la dentina demineralizzata con cellule mesenchimali del midollo osseo.

Si è rilevata quindi la presenza preponderante dei fattori di crescita TGF- β 1 e BMP-2 e si è notato come la presenza di fattori di crescita e di biglicano sia responsabile della chemoattrazione e differenziazione delle cellule

mesenchimali in osteoblasti.

è stato sottolineato dagli autori come il frazionamento e l'eliminazione di alcuni fattori di crescita determini una riduzione del potenziale osteogenetico, mostrando come l'intera matrice extracellulare sia importante nel meccanismo di osteogenesi (Avery et al. 2017).

Tra le BMP è stata molto studiata la BMP-2, per le sue proprietà osteoinduttive, che l'hanno resa l'unica approvata dalla FDA come innesto osseo (James et al., 2016).

La sua azione all'interno delle cellule si esplica attraverso il legame con il recettore che si trova sulla membrana cellulare e fa parte delle proteine serina/tirosina chinasi. L'attivazione di questo recettore determina la fosforilazione delle proteine Smad le quali formano un complesso che trasloca nel nucleo e interagisce con i fattori di trascrizione.

Tra questi ultimi molto importante è Runx-2, che determina la differenziazione delle cellule mesenchimali in osteoblasti, i quali iniziano a produrre tessuto osseo (Chen et al., 2004; Lee et al., 2000).

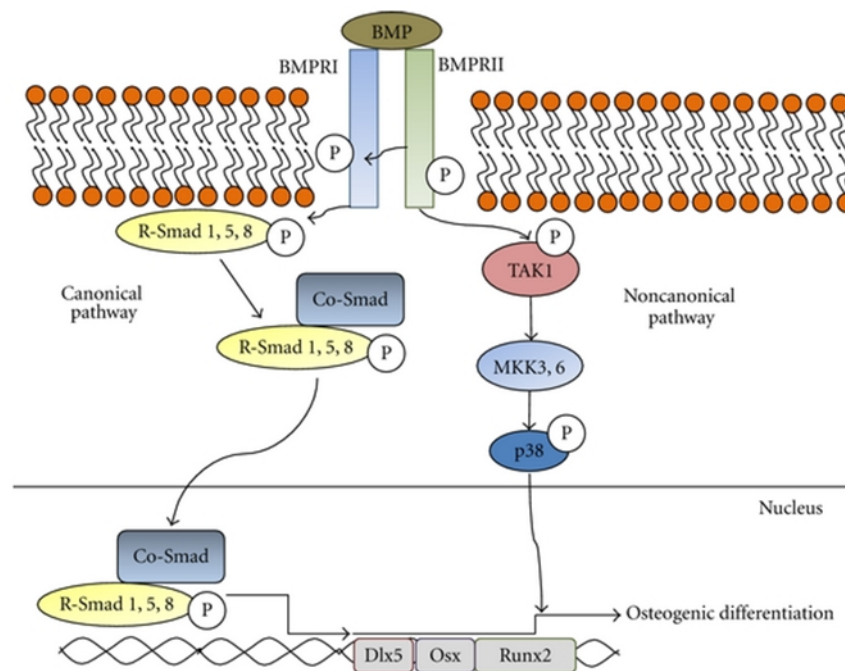


Figura 13. Meccanismo di azione delle BMP (Chenard et al., 2012).

Ovviamente nel processo osteinduttivo sono coinvolti non le BMP, ma anche tutti i fattori di crescita e le altre proteine coinvolte nella matrice.

TGF- β , FGF, PDGF, VEGF e IGF sono implicati nella migrazione, proliferazione e differenziazione di cellule staminali mesenchimali in osteoblasti (Dimitriou et al., 2005; Roberts et Rosenbaum, 2012).

Di recente è stata rilevata la presenza di una proteina di mineralizzazione (LIM-1) nella predentina e all'interno delle cellule endoteliali dei vasi (Wang et al., 2008), la quale sembra essere un regolatore della maturazione e formazione ossea determinando la differenziazione degli osteoblasti (Boden et al., 1998).

OSTEOCONDUTTIVITÀ DELLA MATRICE DEMINERALIZZATA DELLA DENTINA

Gomes et al. (2002) e Carvalho et al. (2004) hanno valutato le proprietà osteoconduttive del DDM autogeno su difetti ossei parietali e difetti di 5 mm dell'osso buccale mandibolare nei conigli. Il DDM è stato completamente incorporato nel tessuto osseo appena formato ed è stato riassorbito durante il rimodellamento osseo.

De Oliveira et al. (2013) hanno eseguito immunocolorazione BMP-2 e BMP-4 negli osteoblasti durante il processo di guarigione delle cavità molari superiori del ratto trattate con DDM umano. I risultati suggeriscono che il DDM umano agisce da impalcatura per la differenziazione degli osteoblasti, producendo attivamente nuovo osso attraverso, almeno in parte, il degrado della matrice e la conseguente consegna controllata di BMP-2 e BMP-4.

Kim et al. (2013) e Lee et al. (2013) hanno confermato l'eccellente capacità di guarigione osteoconduttiva del DDM umano testandolo in difetti di dimensioni critiche nel cranio suino. L'eccellente capacità di osteoconduttività e rimodellamento osseo del DDM umano potrebbe essere attribuita ai suoi minerali, come HA e TCP a bassa cristallinità.



Figura 14. Nuova formazione ossea attorno ai granuli di matrice dentinale demineralizzata. Gli asterischi indicano la matrice di dentina demineralizzata. Ingrandimento x100 (Kim et al., 2012).

Ci che emerge da questi, e da molti altri studi, dunque l'importanza della demineralizzazione affinché si abbiano le proprietà osteogeniche della dentina.

4.3 SOSTANZE DEMINERALIZZANTI

Il processo di demineralizzazione deve avvenire dopo aver rimosso lo smalto e il cemento del dente.

In letteratura non esiste un protocollo standardizzato di demineralizzazione. Le sostanze che si possono utilizzare sono diverse. Le sostanze maggiormente utilizzate sono EDTA e HCL.

L'acido etilendiaminotetraacetico (EDTA) molto utilizzato, ed esiste in concentrazioni diverse.

Uno studio di Fahaimah Sadat Tababtabaei mette a confronto il potenziale rigenerativo di due diversi campioni di dentina: dentina regolare (RD), dentina demineralizzata con EDTA (DemD). I risultati hanno mostrato che DemD ha il potenziale più alto mentre RD ha mostrato il più basso tasso di formazione e di

deposizione di cristalli di idrossiapatite. A quattro settimane, sono stati osservati depositi di idrossiapatite sul campione DemD e sono state osservate numerose masse esagonali di deposito di HA. Il microscopio elettronico a scansione e le analisi quantitative di reazione a catena della polimerasi in tempo reale durante la coltura cellulare di 10 giorni sulle polveri di dentina, hanno mostrato la massima adesione e vitalità cellulare e una rapida differenziazione in DemD. Sulla base dei parametri valutati in questo studio in vitro, il DemD ha mostrato un alto tasso di formazione / deposizione di cristalli di idrossiapatite e adesione / vitalità / differenziazione osteogenica delle cellule staminali della polpa dentale umana, che può supportare il suo potenziale osteoinduttivo / osteoconduttivo per la rigenerazione ossea.

L'EDTA mostra la sua massima azione nell'estrarre le componenti non collageniche della matrice (Tomson et al., 2007).

Parmar e Chhatariya hanno valutato l'effetto demineralizzante dell'EDTA a diverse concentrazioni e pH nel tempo. Hanno suddiviso 20 denti umani estratti in 4 gruppi, dividendo ciascun dente in due parti in senso longitudinale:

- gruppo 1: trattato con EDTA al 17% con pH a 7.5;
- gruppo 2: trattato con EDTA al 17% con pH 9;
- gruppo 3: trattato con EDTA al 10% con pH 7.5;
- gruppo 4: trattato con EDTA al 10% con pH 9.

Per ciascun gruppo è stata rilevata la quantità di fosforo rilasciato a 1, 5, 10, 15 e 25 minuti.

Dai risultati è emerso che, per ogni intervallo di tempo osservato, si è ottenuta la maggiore liberazione di fosforo con pH 7.5 rispetto al pH 9 e con EDTA al 17% rispetto al 10%.

Per quanto riguarda il tempo di demineralizzazione, questo studio ha mostrato che già dopo 1 minuto si sono raggiunti livelli elevati di fosforo rilasciato, che sono continuati ad aumentare fino a 15 minuti, raddoppiando. Un'esposizione prolungata oltre questo tempo, tuttavia, non ha mostrato un aumento

significativo della demineralizzazione.

HCL il demineralizzante più utilizzato. La letteratura afferma che la dentina demineralizzata con HCL determina ottimi risultati in termini di rigenerazione. Murata et al. 2015 hanno dimostrato l'efficacia della dentina demineralizzata con HCL 0,6. I risultati ci mostrano che i granuli di DDM con HCL hanno potenziale osteoinduttivo.

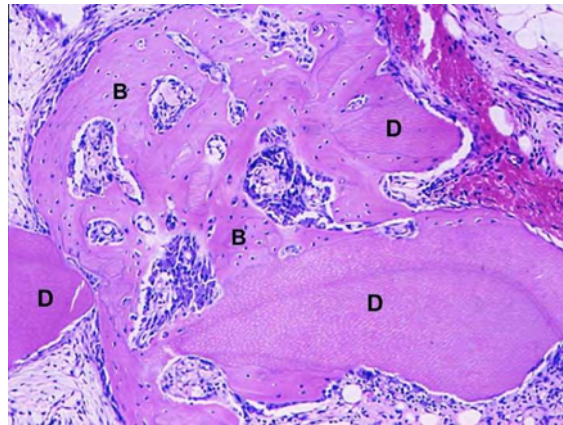


Figura 15. Osso indotto (B) a ponte tra granuli di DDM (D).

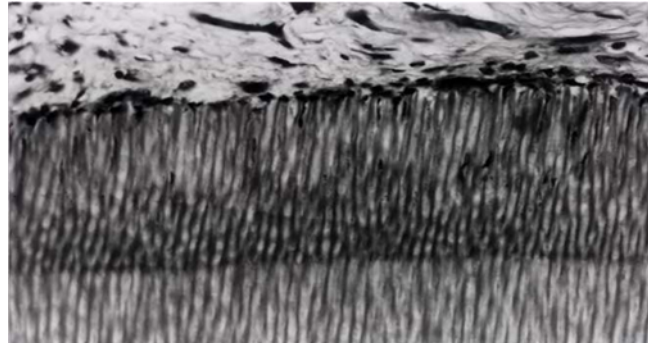


Figura 16. Fibroblasti sulla superficie del granello DDM con tubi dentinali originali. Fotografia in DDM (70mg) a 3 settimane.

Tra le altre sostanze utilizzate per la demineralizzazione abbiamo l'acido nitrico (HNO_3). Meno utilizzato rispetto a EDTA e HCL, ma nonostante ci possiede ottime proprietà demineralizzanti. Murata et al. 2010, hanno demineralizzato i granuli di dentina umana con il 2% di HNO_3 e successivamente li hanno impiantati nel tessuto sottocutaneo di ratto. A 4 settimane si è dimostrata la capacità di indurre cartilagine e osso indipendentemente.

Altra sostanza utilizzata per la demineralizzazione della dentina è l'acido citrico. Tuttavia sono pochi gli studi in cui viene utilizzato. Ha un'azione più blanda e di conseguenza non determina una grande apposizione ossea.

Inoue et al. (1986) hanno confrontato la capacità della dentina di indurre la cartilagine e la formazione ossea dopo demineralizzazione con HCl 0,6 N e Acido citrico 3 M (9 N). Hanno trovato la formazione di cartilagine sulla superficie interna dei granuli di dentina demineralizzata con acido citrico, ma significativamente inferiore a quella sulla dentina demineralizzata con HCl. Tra le soluzioni demineralizzanti, l'acido citrico è quello meno raccomandato.

Molto importante, oltre alla sostanza utilizzata, sono le tempistiche di demineralizzazione ovvero quanto la dentina viene lasciata all'interno della sostanza demineralizzante. In letteratura non esiste un protocollo standardizzato di trattamento della dentina, che risulti essere adeguato ed efficace. Non vi è uniformità di tempistiche di utilizzo dell'acido demineralizzante che garantisca il rilascio di fattori di crescita e proteine dalla matrice extracellulare, senza alterarne la struttura e renderle inattive. Il tempo di demineralizzazione deve essere tale da consentire il rilascio di fattori di crescita, in particolare BMP. Un'eccessiva demineralizzazione determinerebbe una perdita di BMP e altre proteine della matrice, andando a ridurre il potenziale osteoinduttivo e osteogenetico (Pietrzak et al. 2011). Un ridotto tempo di demineralizzazione determinerebbe una matrice molto mineralizzata con conseguente rilascio di piccole quantità di BMP e quindi un minore effetto osteoinduttivo e osteogenetico.

È stato effettuato uno studio per valutare come l'acido possa influenzare il rilascio di fattori di crescita, in particolare le BMP, nel tempo. È stata utilizzata la corticale di osso bovino, tritato e ridotto in particolato, successivamente trattato con acido idrocloridrico a diverse concentrazioni: HCl a 0.125 N, 0.25 N e 0.50 N ed è stata misurata la quantità di BMP-7 dopo 0, 5, 10, 20, 45, 90, 270 minuti e 24 ore di contatto con l'acido.

Il trattamento con HCl a diverse concentrazioni ha mostrato risultati simili, evidenziando la massima quantità di BMP-7 a 90 minuti, tempo necessario per avere una totale demineralizzazione dell'osso con 0.25 N e 0.50 N di HCl. Dopo questo picco il fattore di crescita era presente sempre in minore quantità, con diminuzione progressiva della sua concentrazione fino alle 24 ore. L'azione prolungata dell'acido determina, probabilmente, la perdita della BMP (Pietrzak et al. 2011).

Da questo si capisce l'importanza di avere un protocollo specifico di demineralizzazione che preveda l'uso di una determinata sostanza per un intervallo di tempo definito.

Al momento è presente un solo studio che ha indirizzato la ricerca verso questo ambito.

Lo studio in questione ha utilizzato denti umani, ridotti in particolato di tre diverse granulometrie (200, 500 e 1000 μ m), e sottoposti a demineralizzazione con il 2% di HNO₃.

In base alle dimensioni delle particelle sono stati formati 3 gruppi, ulteriormente divisi in 3 sottogruppi in base al grado di demineralizzazione: non demineralizzati, parzialmente demineralizzati (al 70%) e totalmente demineralizzati.

Sono stati successivamente creati dei difetti ossei nella calvaria di alcuni ratti, che sono stati riempiti con i granuli di dentina dei 9 gruppi, ottenuti in base ai diversi protocolli di preparazione, e sono state effettuate analisi radiografiche e istologiche.

È stata valutata, inoltre, la risposta cellulare degli osteoblasti posti in coltura con ciascun gruppo di dentina.

A 4 e 8 settimane, nei difetti ossei del ratto, si è formato nuovo osso a contatto con i granuli parzialmente e totalmente demineralizzati, mentre la dentina non demineralizzata ha mostrato scarse capacità osteogeniche. In aggiunta, la percentuale di osso neoformato è risultata essere statisticamente maggiore nel gruppo con dentina parzialmente demineralizzata rispetto agli altri, per ciascuna

granulometria.

Gli osteoblasti, osservati al SEM, sono stati visualizzati adesi alle particelle di dentina parzialmente e totalmente demineralizzata, ma non a quelle non demineralizzate.

Per ogni gruppo, infine, si è notato che le particelle di 1000 μ m fossero le più osteoinduttive. Questo studio ha mostrato dunque come la demineralizzazione sia necessaria affinché la dentina acquisisca la capacità di stimolare neoformazione ossea e come il grado di demineralizzazione influenzi notevolmente le sue proprietà. Una demineralizzazione parziale, al 70%, sembra indurre una migliore risposta osteoblastica e, di conseguenza, una maggior quantità di tessuto osseo (Koga et al., 2016).

4. PARTE SPERIMENTALE

4.1. OBIETTIVO

Lo studio condotto in questa tesi si pone l'obiettivo di andare ad analizzare il grado di demineralizzazione dei granuli di dentina, ottenuti tramite estrazione di un elemento dentale sottoposto ad agente demineralizzante per differenti intervalli di tempo.

Studiare le proprietà e il comportamento di questo tessuto, utilizzato come biomateriale, è di fondamentale importanza al fine di ottenere una buona guarigione del sito post estrattivo.

La dentina e il tessuto osseo hanno composizione chimica simile. Per questo motivo, il dente autogeno può essere considerato come biomateriale per la rigenerazione ossea.

In questo studio i granuli di dentina sono stati sottoposti a 4 differenti tempi di demineralizzazione. Le analisi che sono state condotte hanno previsto l'utilizzo della spettroscopia infrarossa, che studia l'interazione tra la materia e la

radiazione infrarossa; in particolare è stato utilizzato il vicino infrarosso (NIR, *Near Infrared Spectroscopy*) e il medio infrarosso (MIR, *Mid-Infrared Spectroscopy*).

Inoltre, con il Microscopio Elettronico a Scansione (SEM) è stata effettuata la valutazione morfologica della superficie dei granuli di dentina. Infine, con la spettroscopia EDS (*Energy Dispersive X-ray Spectrometry*) è stata valutata la composizione chimica dei campioni. Nello specifico, gli obiettivi della tesi sono stati:

1. Valutare e paragonare la composizione chimica della dentina sottoposta a 5 differenti protocolli di demineralizzazione;
2. Analizzare e paragonare la morfologia di superficie della dentina sottoposta a 5 differenti protocolli di demineralizzazione.

4.2 MATERIALI E METODI

4.2.1. PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

Previo consenso informato, sono stati estratti due elementi dentari, da due pazienti sani. I denti erano privi di patologie ed è stato rimosso tutto lo smalto attraverso l'utilizzo di una fresa diamantata (Figura 17).

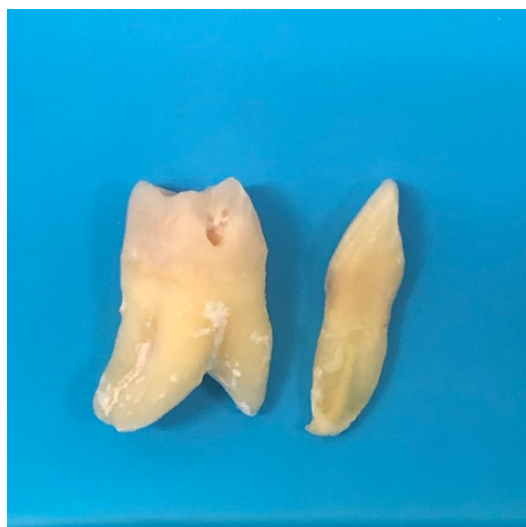


Figura 17. *Denti estratti utilizzati per lo studio, privati dello smalto attraverso l'utilizzo di una fresa diamantata.*

Successivamente, gli elementi sono stati lavati con soluzione fisiologica, asciugati con una siringa ad aria e conservati in frigorifero a -20 °C.

Per la fase seguente, quella della triturazione del dente, è stata utilizzata la macchina Smart Dentin Grinder (KometaBio Inc., Cresskill, NJ, USA), un dispositivo creato appositamente per questa procedura (Figura 18). I denti sono stati posizionati all'interno di una camera sterile di triturazione (Figura 21) e triturati per 3 secondi.

Dopo averli passati al setaccio, è stato possibile ottenere due tipologie di granulometria differenti: in un contenitore sterile sono stati raccolti granuli di dimensione inferiore a 300 µm (A), mentre in un secondo contenitore sterile sono stati raccolti granuli di dimensioni comprese tra 300 µm e 1200 µm (B) (Figura 19).



Figura 18. *Macchina Smart Dentin Grinder (KometaBio Inc., Cresskill, NJ, USA).*



Figura 19. *Denti posizionati nella camera sterile di triturazione.*



Figura 20. *(A) Dentina triturata con granulometria inferiore a 300 μ m (B) dentina triturata con granulometria compresa tra 300 μ m e 1200 μ m.*

In questo studio è stata utilizzata solo dentina con granulometria compresa tra 300 μ m e 1200 μ m (B).

4.2.2 PROTOCOLLI DI DEMINERALIZZAZIONE

Il particolato ottenuto è stato posizionato in un contenitore di vetro sterile e immerso per 10 minuti in alcol basico seguendo le istruzioni della macchina. La composizione dell'alcol basico è 0.5 M di NaOH e 20% di etanolo. Nella fase seguente il particolato è stato rimosso dal contenitore e, lavato due volte con soluzione salina sterile (PBS) tamponata con fosfato (3 minuti per ciascun lavaggio) (Figura 21).



Figura 21. *Particolato di dentina sottoposto a soluzione salina sterile (PBS) in un contenitore sterile.*

stato poi eseguito un lavaggio con soluzione fisiologica e il particolato stato asciugato, cercando di lasciare la dentina il più secca possibile.

Il processo di demineralizzazione stato eseguito con EDTA Sale Disodico, sciolto in acqua distillata, ad una concentrazione di 12%.

Più precisamente 1,7 g di EDTA Sale Disodico stato sciolto in 10 ml di acqua distillata ad una temperatura di 25 °C. stata ottenuta una soluzione satura, per cui, seguendo la scheda tecnica della sostanza, stato prelevato solo il surnatante, ottenendo una concentrazione del 12 %. La percentuale di EDTA stata scelta sulla base della letteratura scientifica. Ad ogni campione stato aggiunto 1,1 ml di EDTA e lasciato agire, agitando attraverso il Vortex, per il tempo stabilito da protocollo.

I granuli di dentina così trattati sono stati suddivisi in 6 gruppi (0.075 g di dentina per ogni campione), in base al tempo di demineralizzazione (Tabella 2). Per ogni gruppo sono stati analizzati 5 campioni.

Nomenclatura *Campione*

<i>T0</i>	Dentina triturrata e non demineralizzata
-----------	--

<i>T2</i>	Dentina triturata e demineralizzata per 2 minuti in EDTA al 12%
<i>T5</i>	Dentina triturata e demineralizzata per 5 minuti in EDTA al 12%
<i>T10</i>	Dentina triturata e demineralizzata per 10 minuti in EDTA al 12%
<i>T20</i>	Dentina triturata e demineralizzata per 20 minuti in EDTA al 12%
<i>T60</i>	Dentina triturata e demineralizzata per 60 minuti in EDTA al 12%

Tabella 2. *Campioni analizzati nello studio.*

Dopo la demineralizzazione, l'EDTA è stato prelevato e conservato. Ciascun campione è stato lavato con soluzione fisiologica (400 µL soluzione fisiologica per due volte). Dopo di che la soluzione fisiologica è stata aspirata.

Per la valutazione allo spettrofotometro i campioni devono essere privi di acqua al fine di non avere interferenze nello spettro. Tutti i campioni, a questo punto, per 30 minuti sono stati posizionati all'interno di una centrifuga per l'eliminazione dell'acqua residua. (SpeedVac Concentrator, Savant SPD111V) (Figura 22).



Figura 22. *I campioni sono stati inseriti all'interno della centrifuga (SpeedVac Concentrator, Savant SPD111V), per l'eliminazione*

dell'acqua residua.

4.2.3 ANALISI STRUMENTALI

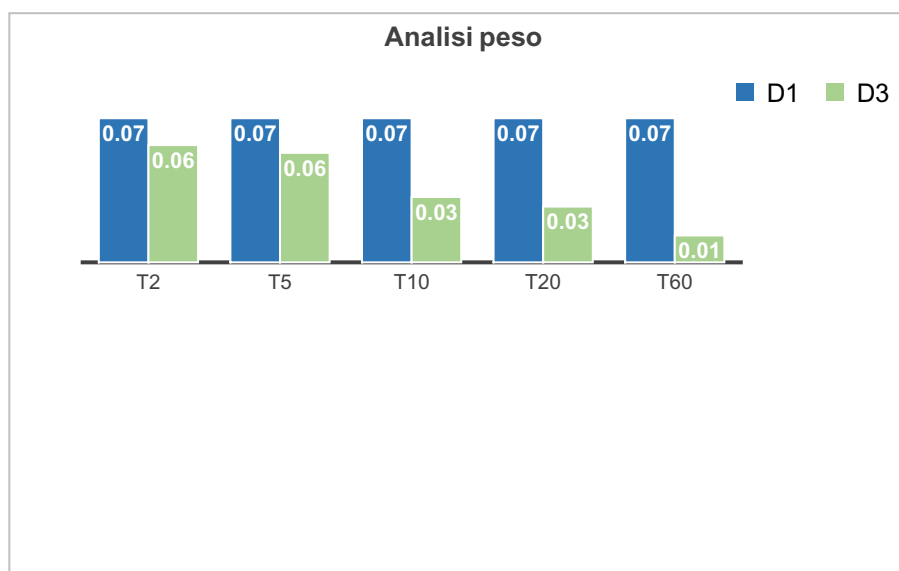
Analisi del peso dei campioni

Ciascun campione è stato pesato (peso espresso in grammi) a tre tempistiche differenti (Tabella 3 A-B, in cui è indicato il peso medio dei 5 campioni per ciascun gruppo):

- Dentina triturata e centrifugata (D1);
- Dentina triturata e demineralizzata (D2);
- Dentina triturata, demineralizzata e centrifugata (D3).

	T2	T5	T10	T20	T60
D1	0.075	0.075	0.075	0.075	0.075
D2	0.093	0.081	0.051	0.036	0.024
D3	0.061	0.057	0.034	0.029	0.014

(A)



(B)

Tabella 3.

(A) Peso dei campioni (gr) registrato in D1 (dentina triturata e centrifugata), D2 (dentina triturata e demineralizzata), D3 (dentina triturata, demineralizzata e

centrifugata).

(B) *Grafico rappresentante la riduzione del peso della dentina D3, rispetto al peso iniziale uguale per ciascun campione in D1.*

Analisi FT-MIR Medio infrarosso

L'analisi stata condotta attraverso l'utilizzo dello strumento FT-IR Perkin Elmer Spectrum One (Figura 23), in dotazione presso il laboratorio di Spettroscopia Infrarossa, Dipartimento SIMAU, Universit Politecnica delle Marche.

L'analisi di tutti i campioni stata effettuata in modalit UATR, *Attenuate Total Reflection*, in riflessione, con un range di acquisizione compreso nell'intervallo tra $4000\text{-}600\text{ cm}^{-1}$ (risoluzione spettrale 4 cm^{-1} , 16 scansioni) (Figura 24).

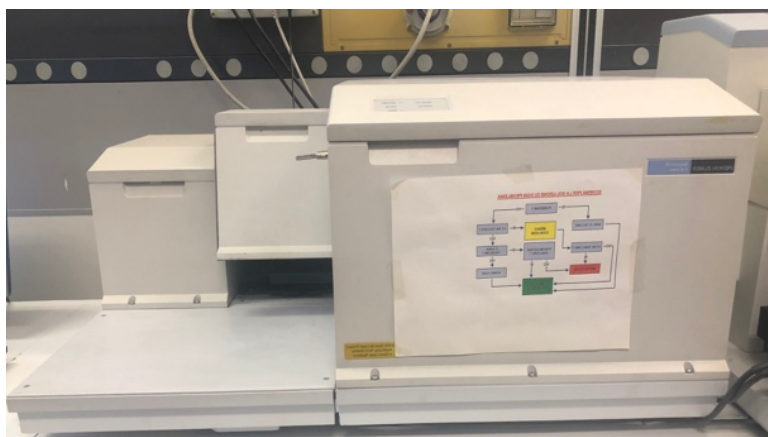
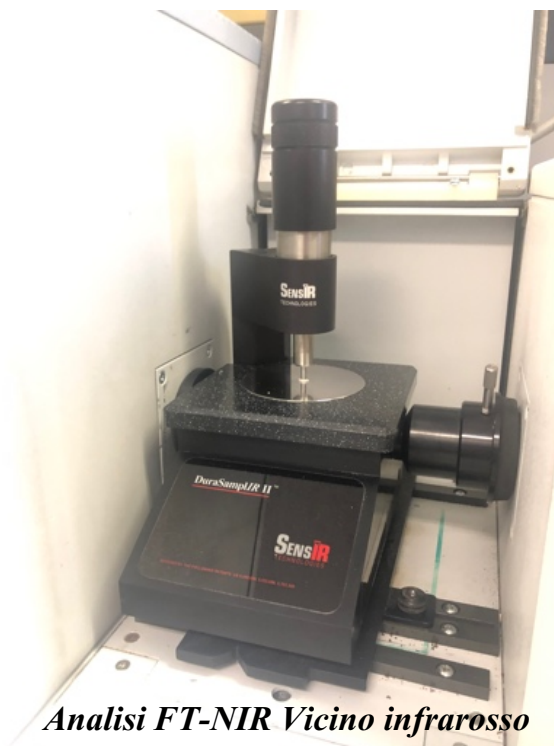


Figura 23. *FT-IR, Perkin Elmer Spectrum One, Medio infrarosso. Range di acquisizione $4000\text{-}450\text{ cm}^{-1}$.*

Figura 24. *Supporto utilizzato per la modalit UATR, attenuate total reflection.*



Analisi FT-NIR Vicino infrarosso

Valutazione della composizione chimica attraverso l'utilizzo dello Spettrofotometro FT-NIR Spectrum One (Perkin Elmer).

Gli spettri sono stati acquisiti in riflessione con un range di acquisizione compreso tra 10000-4000 cm^{-1} e risoluzione di 4 cm^{-1} (Figura 25-26).

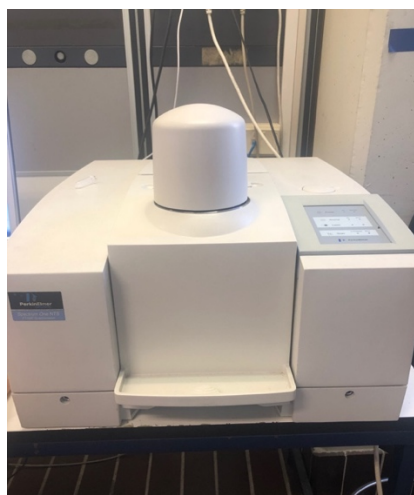


Figura 25. Spettrofotometro FT-NIR Perkin Elmer Spectrum One.

Figura 26. Supporto utilizzato nello Spettrofotometro FT-NIR per l'analisi in riflessione. Il campione viene posizionato



all'interno dell'apposito alloggiamento (NIRA).

Lo spettrofotometro è composto da:

1. Una lampada alogena con filamento di tungsteno riscaldato fino a 2600 °C che funge da sorgente di luce infrarossa. Tale sorgente copre un intervallo spettrale che va dalla regione dell'ultravioletto fino a quella dell'infrarosso;
2. Un interferometro di Michelson, composto da una serie di specchi fissi e mobili, che genera l'intera gamma delle radiazioni NIR;
3. Un detector, del tipo DTGS, che permette di registrare l'intensità dei segnali assorbiti o trasmessi dal campione.

La radiazione infrarossa NIR, prodotta dalla sorgente, entra nell'interferometro e viene quindi fatta passare attraverso il campione.

Le radiazioni prodotte dallo spettrometro che provocano transizioni vibrazionali nel campione nell'intervallo spettrale del NIR vengono assorbite dal campione stesso; l'intensità di tali assorbimenti viene registrata dal detector e riportata nello spettro.

Analisi microscopio elettronico a scansione

Sono stati, successivamente analizzati i campioni attraverso il microscopio elettronico a scansione (SEM). I campioni sono stati sottoposti a doratura, al

fine di renderli conduttivi per l'analisi. Attraverso l'utilizzo del detector SE2 stata valutata la morfologia di superficie di ciascun campione a differenti ingrandimenti: 400x, 2000x e 8000x (Figura 27).

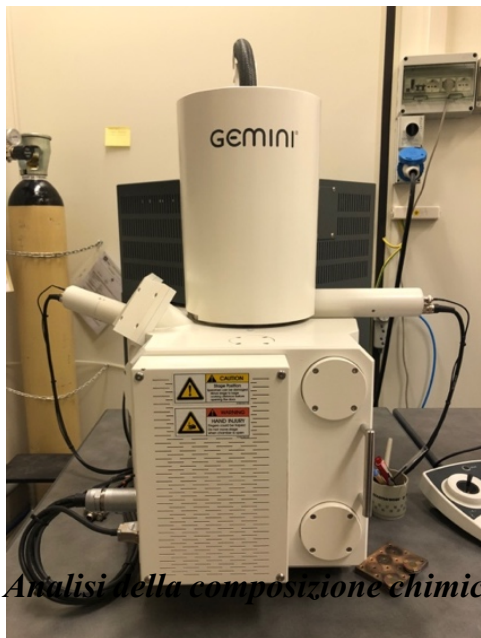


Figura 27. *Microscopio elettronico a scansione (Supra 40, Zeiss).*

Analisi della composizione chimica attraverso la spettroscopia EDS

La spettroscopia EDS (Energy Dispersive X-ray Spectrometry) è una metodica analitica strumentale che sfrutta l'emissione di raggi X generati da un fascio elettronico accelerato incidente sul campione e permette di rilevare gli elementi chimici di cui è formato il campione.

I dati generati dall'analisi EDX sono costituiti da spettri con picchi corrispondenti a tutti i diversi elementi presenti nel campione. Ogni elemento presenta picchi caratteristici di energia unica, che si possono trovare nella bibliografia.

Inoltre, l'EDX può essere utilizzato sia nell'analisi qualitative (le tipologie di elementi) che quantitative (la percentuale di concentrazione di ogni elemento nel campione). Nella maggior parte dei SEM, software dedicati consentono l'identificazione di picchi e il calcolo della percentuale atomica di ogni elemento che viene rilevato.

In questo studio è stato utilizzato il microscopio a scansione di elettroni TESCAN VEGA3 (Figura 28), equipaggiato con il dispositivo per la microanalisi EDAX Element, in dotazione presso il dipartimento SIMAU, dell'Università Politecnica delle Marche.

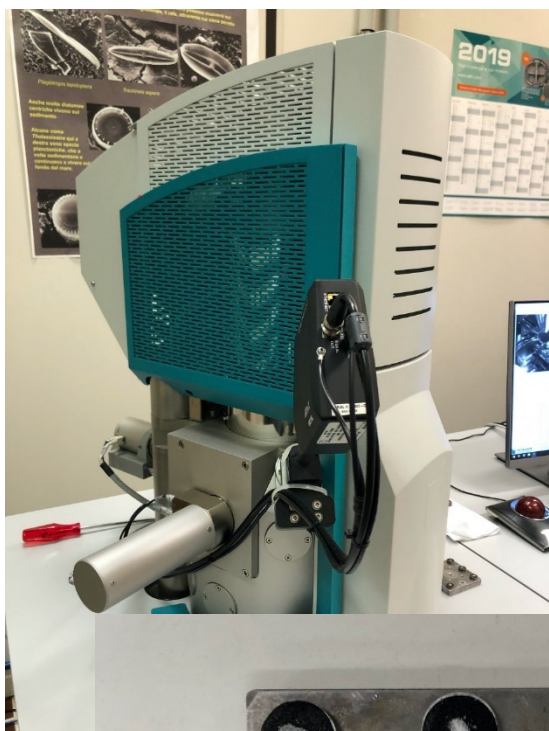


Figura 28. *Microscopio SEM
TESCAN VEGA3.*



Figura 28a. *Campioni
disposti nei supporti e
dorati per l'analisi
EDS.*

5. RISULTATI

Per ogni campione sono stati acquisiti gli spettri MIR, nell'intervallo spettrale $4000-600\text{ cm}^{-1}$, e NIR, nell'intervallo $10000-4000\text{ cm}^{-1}$. Le principali bande di assorbimento MIR, considerate in questo studio, sono indicate in Figura 31, in

cui è riportato lo spettro della dentina non sottoposta a demineralizzazione (T0). Sulla base di studi precedenti (Kolmas et al., 2010; Iafisco et al., 2012), le principali bande di assorbimento analizzate in questo studio sono state:

- La banda a 1649 corrispondente alla componente proteica della dentina (banda A);
- La banda a 1021 attribuibile allo ione fosfato PO_4^{3-} (banda B);
- La banda a 872 attribuibile allo stretching del carbonato CO_3^{2-} (banda C).

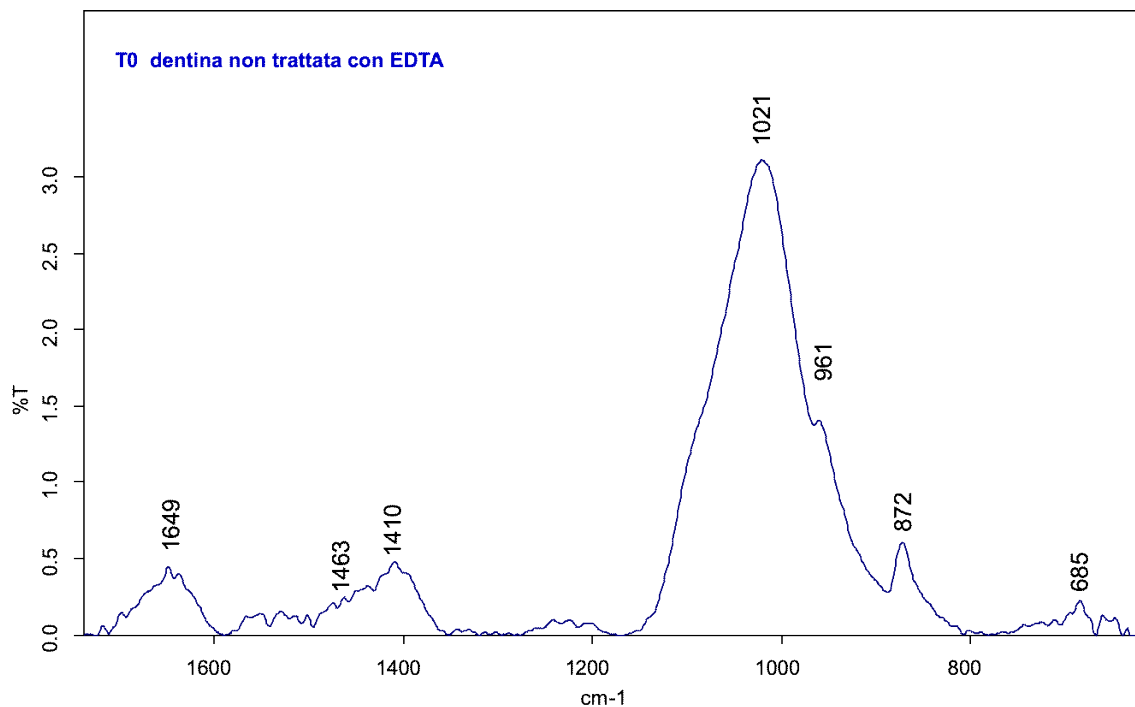


Figura 29. Spettro acquisito attraverso l'analisi FT-MIR del particolato di dentina non sottoposta a demineralizzazione con EDTA.

Nella Figura 30 è riportata la variazione dei profili spettrali dei campioni testati.

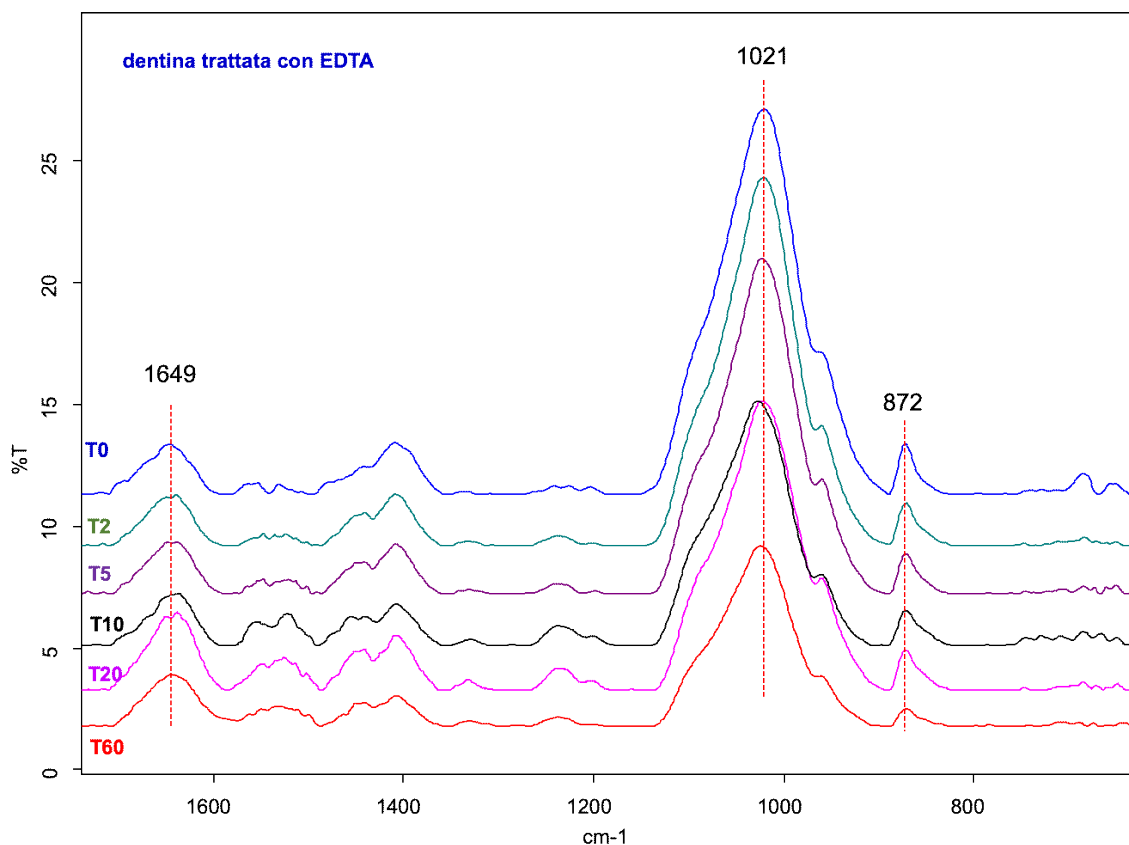
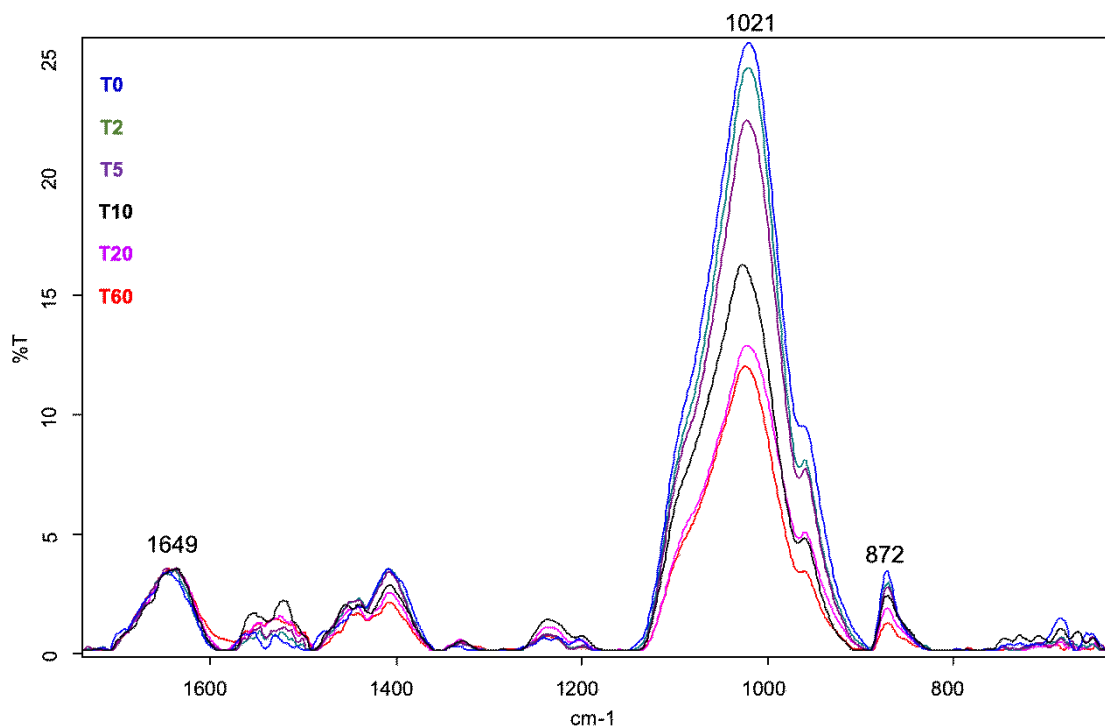


Figura 30. *Variazione del profilo spettrale MIR dei campioni analizzati (T0, T2, T5, T10, T20, T60), acquisiti nell'intervallo spettrale 4000-600 cm^{-1} . Le principali bande di assorbimento, analizzate in questo studio, sono indicate da linee tratteggiate.*

Normalizzando gli spettri ottenuti rispetto alla banda a 1649, che rappresenta la componente proteica della dentina, la quale rimane costante anche dopo il trattamento di demineralizzazione, è possibile notare l'andamento del gruppo PO_4^{3-} e del gruppo CO_3^{2-} (Figura 31).

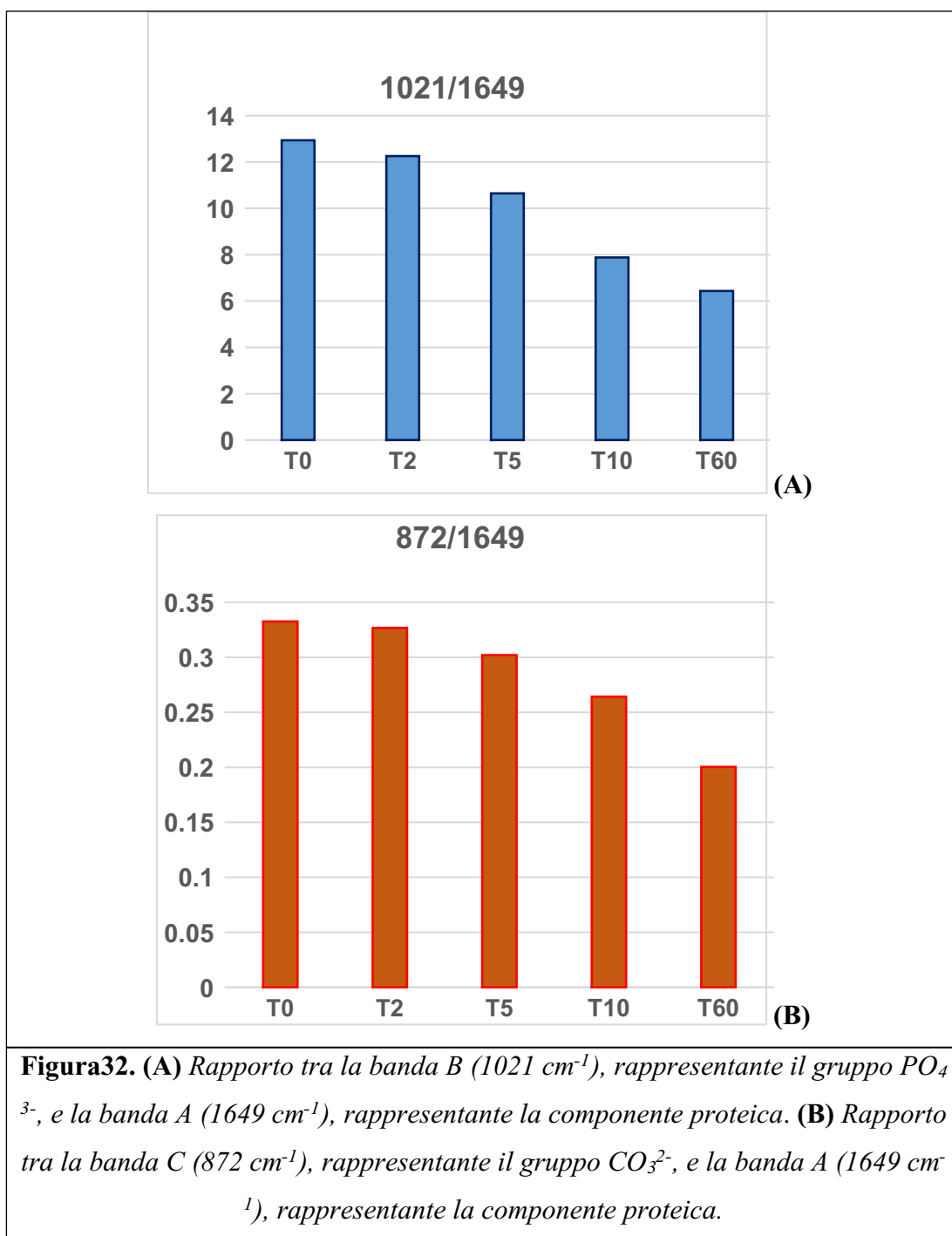
Figura 31. Spettri dei campioni analizzati normalizzati a livello della banda



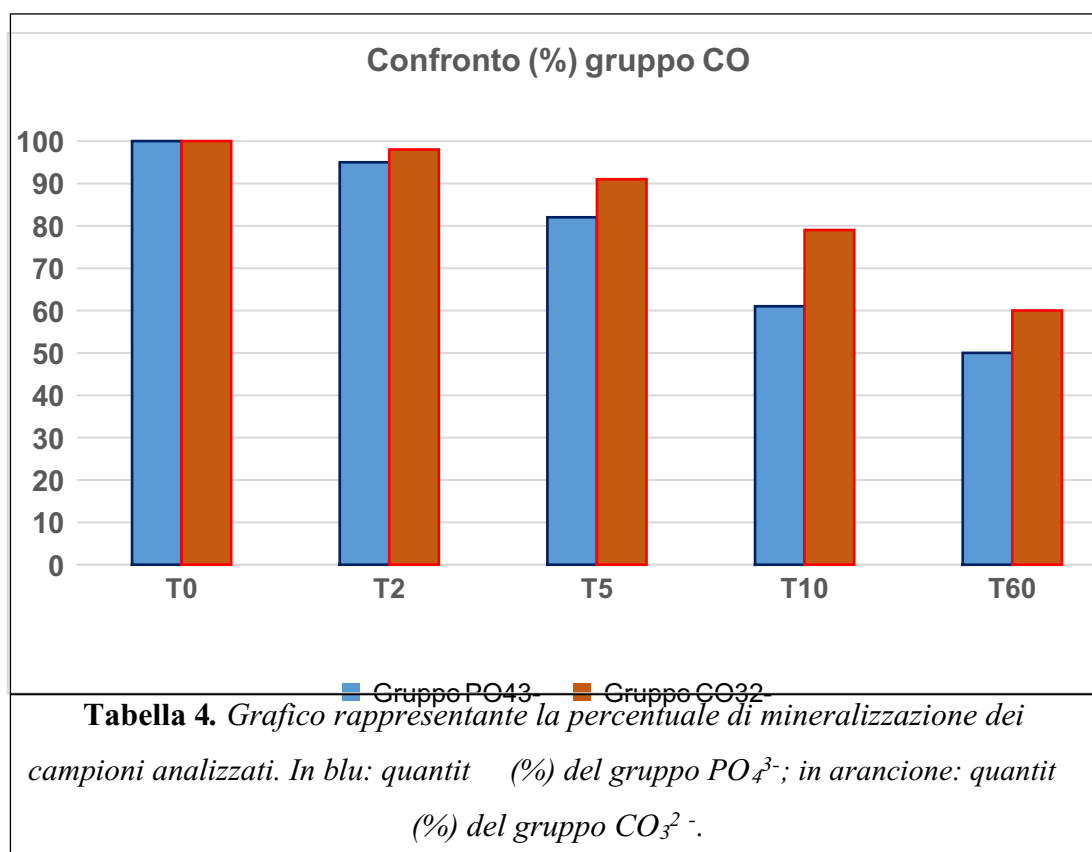
a 1649, corrispondente alla componente proteica della dentina. Si nota la riduzione della banda a 1021, corrispondente al gruppo fosfato e quella a 872, corrispondente al carbonato.

La riduzione della componente inorganica della dentina (gruppo PO_4^{3-} e CO_3^{2-}) aumenta con l'aumentare del tempo di esposizione all'agente demineralizzante. La quantità di componente mineralizzata nella dentina maggiore in T0, seguito da T2, T5, T10. T60 mostra la minor quantità di componente mineralizzata, essendo sottoposto al maggior tempo di demineralizzazione. La percentuale di mineralizzazione di ciascun campione stata calcolata eseguendo il rapporto tra la banda B, rappresentante la percentuale di PO_4^{3-} e la banda A (componente proteica che rimane invariata).

In seguito, stata rapportata la banda C, corrispondente alla percentuale CO_3^{2-} , con la banda A (Figura 32). Come riferimento stato considerato T0, dentina non trattata con EDTA 12%, al quale stato assegnato il valore di 100% di



mineralizzazione. Così facendo è stata calcolata, in percentuale, per ciascun campione, la quantità di PO_4^{3-} e di CO_3^{2-} (Tabella 4).



Successivamente stata eseguita al SEM una valutazione morfologica dei campioni (Figura 33). Dalle immagini acquisite a differenti ingrandimenti (400x, 2000x e 8000x) sono visibili i tubuli dentinali. A parit di superficie, il numero di questi tubuli visibile nelle immagini a 2000x di ingrandimento, aumenta passando da $T0 < T2 < T5 < T10 < T20 < T60$.

possibile notare una differenza a livello della superficie confrontando l'immagine a 8000x di ingrandimento di T0 con quella di T60: in T0 la superficie della dentina ruvida e non omogenea, mentre quella in T60 pi liscia ed omogenea. Concludendo quindi che la rugosit di superficie tende a ridursi aumentando il tempo di demineralizzazione (Tanoue et al., 2018).

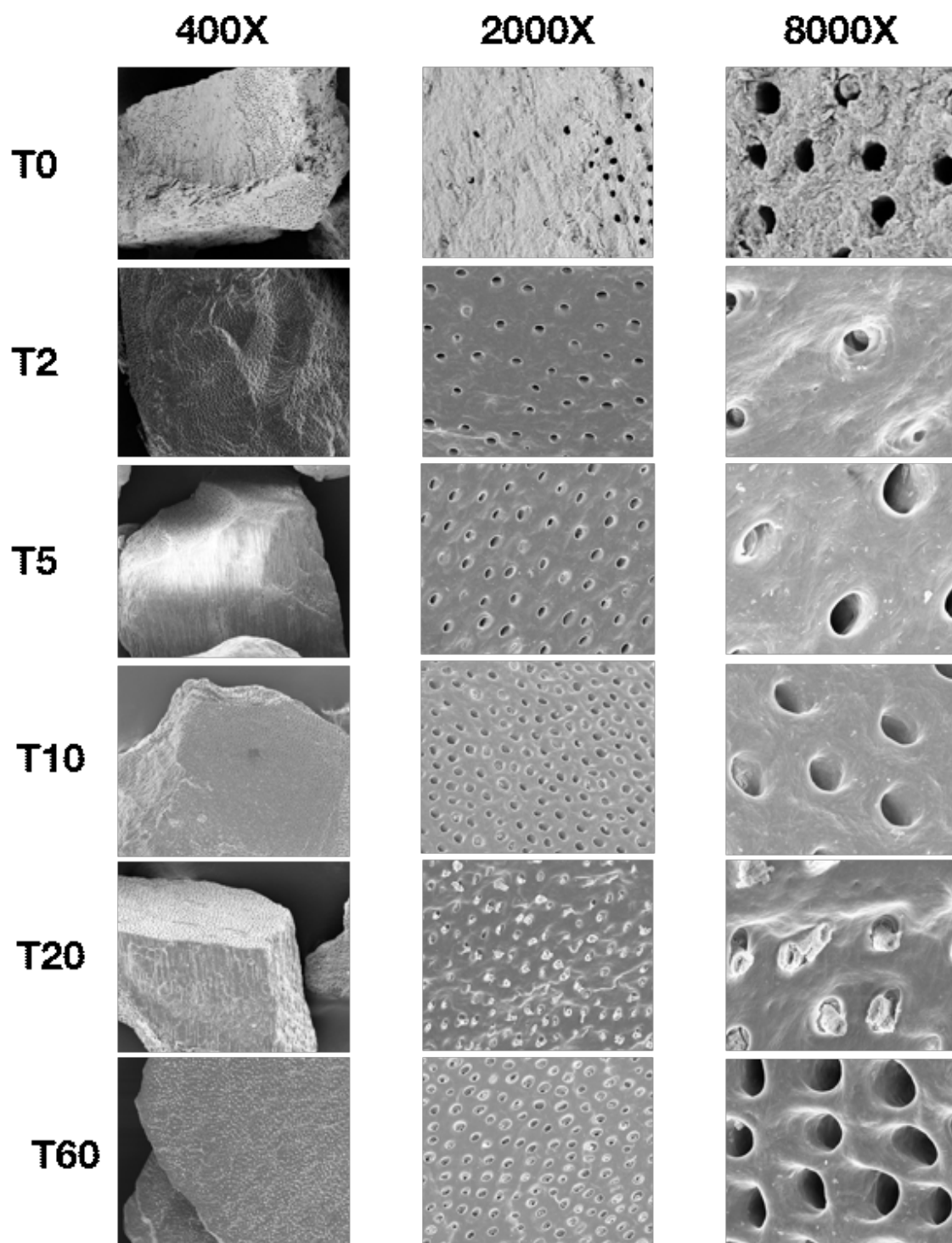
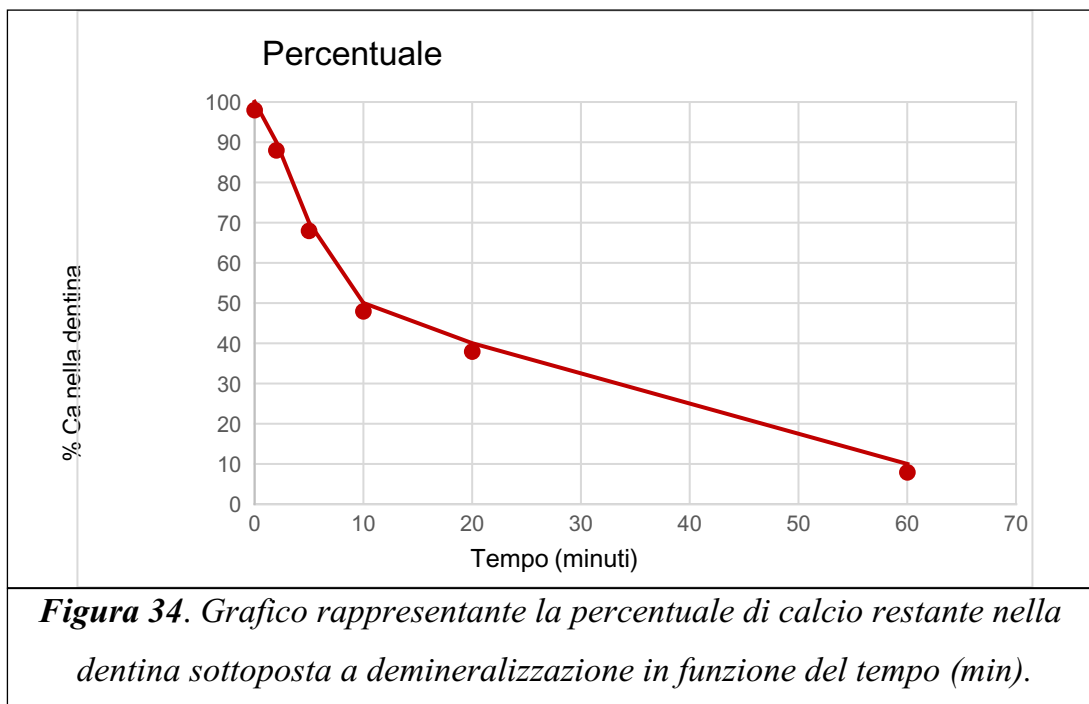


Figura 33. Immagini acquisite al SEM dei campioni T0, T2, T5, T10, T20, T60 a differenti ingrandimenti: 400x, 2000x e 8000x.

Dai dati ottenuti dalla microanalisi emerge che la quantità di calcio e fosforo rilasciata tende ad aumentare con l'aumentare del tempo di demineralizzazione

(Figura 34). Considerando che l'EDTA è un chelante del calcio, la riduzione di Ca è maggiore rispetto a quella di P, aumentando il tempo di demineralizzazione.



è possibile notare che la demineralizzazione presenta un andamento non lineare, dal momento che è maggiore nei primi 10 minuti, e poi tende a ridursi, fino a mantenere un andamento costante.

Dopo i primi 10 minuti la demineralizzazione continua del 10% circa ogni 10 minuti.

Dall'analisi dei dati ottenuti è stato possibile riassumere i risultati come segue:

- Il gruppo carbonato (componente inorganica della dentina, riferito al picco spettrale a 872) si riduce all'aumentare del tempo di demineralizzazione: la sua quantità decresce passando da $T_0 > T_2 > T_5 > T_{10} > T_{20} > T_{60}$;
- Il gruppo fosfato (componente inorganica della dentina, riferito al picco spettrale a 1021) si riduce all'aumentare del tempo di demineralizzazione: la sua quantità decresce passando da

T0>T2>T5>T10>T20>T60;

- Il numero di tubuli dentinali esposti a parità di superficie aumenta con l'aumentare del tempo di demineralizzazione;
- Il peso D3 di ciascun campione risultato inferiore rispetto al peso iniziale D1;
- Aumentando il tempo di demineralizzazione la superficie del campione diventa più omogenea e più liscia;
- La quantità di Ca contenuta nei campioni tende a ridursi con l'aumentare del tempo di demineralizzazione, soprattutto nei primi 10 minuti;
- La demineralizzazione del 70 % della dentina, come riportato in letteratura, è il valore ottimale grazie alla quale si ha il maggior rilascio di fattori di crescita e proteine, in particolare BMP-2, e di conseguenza è la percentuale migliore per la rigenerazione. Questa percentuale corrisponde a circa 30/35 minuti di demineralizzazione con EDTA al 12%.

6. DISCUSSIONE

In questo studio l'obiettivo principale è stato quello di analizzare il grado di demineralizzazione della dentina triturata e sottoposta ad agente demineralizzante (EDTA sale disodico al 12%) per differenti intervalli di tempo.

L'obiettivo finale è stato quello di fornire consigli al clinico sul tempo di demineralizzazione ottimale della dentina con EDTA sale disodico al 12%.

La componente minerale del dente, come descritto precedentemente, costituita principalmente da calcio fosfato sotto forma di cristalli di idrossiapatite (HA).

Questi ultimi contengono una piccola quantità di elementi quali Cl, Mg, Cu, K, Fe, Sr e una grande quantità di ioni carbonato (Teruel et al., 2015). L'idrossiapatite contenuta nella dentina rappresenta il 70% in peso.

Il carbonato si può trovare incorporato in HA, al posto dello ione idrossile (OH), formando l'idrossiapatite carbonato tipo A (CHA), oppure può sostituirsi al gruppo fosfato PO_4^{3-} e diventare idrossiapatite carbonato tipo B (Barralet et al., 1998; Ortiz-Ruiz et al., 2018). L'EDTA è solitamente utilizzato in ambito endodontico, si tratta di un agente chelante utilizzato per consentire l'allargamento dei canali radicolari, data la sua capacità di rimuovere lo *smear layer*. (Parmar et Chhtariya, 2004).

Nella realizzazione di questa tesi è stato utilizzato EDTA sale disodico ad una percentuale del 12% per demineralizzare i granuli di dentina in 6 differenti intervalli di tempo. L'EDTA ha la capacità di legarsi agli ioni Ca dei cristalli di idrossiapatite e formare dei sali solubili. L'EDTA è un chelante del Ca.

La demineralizzazione ottenuta è stata rilevabile:

- Dal punto di vista quantitativo, in quanto il peso (gr) della dentina demineralizzata è risultato inferiore rispetto alla dentina non demineralizzata;
- Dal punto di vista spettroscopico, in quanto le bande relative alla componente inorganica (gruppo CO_3^{2-} e gruppo PO_4^{3-}) si riducono nel tempo rispetto alla componente proteica che rimane costante;
- Dal punto di vista morfologico, in quanto al SEM è possibile notare un aumento dell'esposizione dei tubuli dentinali e una superficie più liscia e più omogenea man a mano che aumenta il tempo di demineralizzazione.
- Dal punto di vista quantitativo, attraverso la microanalisi, in quanto la percentuale in peso di Ca tende a ridursi con l'aumentare del tempo di demineralizzazione.

La superficie più liscia, rilevata nei campioni T10 - T20 - T60, rispetto a T0 è una caratteristica rilevante, perché una superficie liscia e regolare è più adatta per la proliferazione e differenziazione degli osteoblasti, mentre una superficie rugosa può dare inizio a una risposta da parte dei macrofagi, con risultante la perdita di osso (Kim et al., 2014; Tabatabaei et al., 2016).

Il network di distribuzione di nutrienti può essere svolto dai tubuli dentinali (Kim et al., 2010) e di conseguenza, la crescente esposizione dei tubuli, facilita la liberazione di fattori di crescita.

Secondo quanto riportato in letteratura, la dentina parzialmente demineralizzata (70% di demineralizzazione), induce migliori effetti durante il processo di rigenerazione ossea, dal momento che possiede una superficie più adatta per l'attaccamento cellulare. Inoltre, è stato dimostrato che possiede un ottimo equilibrio tra riassorbimento e formazione ossea. Per questo motivo, potrebbe essere considerata come un'alternativa come biomateriale.

Questo studio permette di fornire al clinico indicazioni su come utilizzare l'EDTA (12%) come agente demineralizzante. Infatti, per avere una demineralizzazione efficace bisogna demineralizzare la dentina per 30-35 minuti.

L'EDTA richiede un tempo di demineralizzazione maggiore, se confrontato con altri agenti come l'acido nitrico al 2%. Infatti, nell'articolo di Koga et al., 2016, gli autori riportano che il tempo ideale per ottenere una demineralizzazione del 70% di circa 20 minuti in acido nitrico al 2%.

7. CONCLUSIONI

Sulla base dello studio compiuto, è stato possibile osservare come il tempo di demineralizzazione dentinale sia fondamentale nei processi di rilascio dei fattori osteogenici. Tuttavia, un protocollo di demineralizzazione inadeguato produce innesti con proprietà osteoinduttive e osteoconduttive basse.

La nuova frontiera è l'impiego di elementi dentari recuperati da estrazione, tritati e opportunamente processati prima dell'utilizzo clinico, come innesti, anche se generalmente vengono considerati rifiuti e non utilizzati. La dentina, ha caratteristiche del tutto favorevoli nel suddetto impiego, alcune delle quali sono l'assoluta biocompatibilità, ricchezza biologica e sostenibilità.

La ricerca al giorno d'oggi non ha identificato un protocollo standard da seguire nel processo di demineralizzazione. Il tipo di sostanza demineralizzante da usare, come neanche il tempo di demineralizzazione specifico per ottenere la liberazione dei fattori di crescita. Non vi sono, inoltre, studi che dimostrino quale sia la granulometria giusta per ottenere un'efficace e veloce guarigione.

I risultati ottenuti in questo studio preliminare *in vitro* hanno permesso di capire cosa avviene durante il processo di demineralizzazione con EDTA al 12%. In definitiva, il tempo di demineralizzazione ha un impatto sia dal punto di vista morfologico di superficie che dal punto di vista molecolare. Il passo successivo corrisponde alla valutazione della risposta cellulare degli osteoblasti a contatto con dentina demineralizzata per intervalli di tempo differente. Sarà possibile così definire il tempo di demineralizzazione ottimale che consenta una valida risposta cellulare.

8. BIBLIOGRAFIA

About I, Laurent-Maquin D, Lendahl U, Mitsiadis TA. Nestin expression in embryonic and adult human teeth under normal and pathological conditions. *Am J Pathol.* 2000 Jul;157(1):287-95.

Andersson L, Ramzi A, Joseph B. Studi su innesti di dentina per difetti ossei nella tibia e nella mandibola del coniglio; sviluppo di un modello sperimentale. *Dent Traumatol.* 2009; 25 : 78–83

Andersson L. Gli xenotrapianti Andersson L. Dentine per difetti ossei sperimentali nella tibia di coniglio sono anchilosati e sottoposti a sostituzione ossea. *Dent Traumatol.* 2010; 26 : 398–40.

Avery SJ, Sadaghiani L, Sloan AJ, Waddington RJ. Analysing the bioactive makeup of demineralised dentine matrix on bone marrow mesenchymal stem cells for enhanced bone repair. *Eur Cell Mater.* 2017 Jul 10;34:1-14.

Bang G, Urist MR. Bone induction in excavation chambers in matrix of decalcified dentin. *Arch Surg.* 1967 Jun;94(6):781-9.

Bertassoni LE., Dentine on the nanoscale: Hierarchical organization, mechanical behaviour and bioinspired engineering. *Dent Mater.* 2017 Jun;33(6):637-649.

Bertassoni LE, Orgel JP, Antipova O, Swain MV. The dentin organic matrix - limitations of restorative dentistry hidden on the nanometer scale. *Acta Biomater.* 2012 Jul;8(7):2419-33.

Boden S. D, Liu Y, Hair G. A, Helms J. A, Hu D, Racine M, Nanes M. S, & Titus L. LMP-1, a LIM-domain protein, mediates BMP-6 effects on bone formation. *Endocrinology*. Dec;139(12):5125-34.

Boneward L. F. Osteocytes: A proposed multifunctional bone cell. *Journal of Musculoskeletal and Neuronal Interactions*. 2002; 2, 239-241.

Bouleftour W, Juignet L, Bouet G, Granito RN, Vanden-Bossche A, Laroche N, Aubin JE, Lafage-Proust MH, Vico L, Malaval L. The role of the SIBLING, Bone Sialoprotein in skeletal biology - Contribution of mouse experimental genetics. *Matrix Biol*. 2016 May-Jul;52-54:60-77.

Bronckers AL, Price PA, Schrijvers A, Bervoets TJ, Karsenty G. Studies of osteocalcin function in dentin formation in rodent teeth. *Eur J Oral Sci*. 1998; 106:795–807.

Burr, D.B., Martin, R.B., Schaffer, M.B. & Radin, E.L. Bone remodelling in response to in vivo fatigue microdamage. *Journal of Biomechanics*. 1985; 18, 189-200.

Carreira AC, Zambuzzi WF, Rossi MC, Astorino Filho R, Sogayar MC, Granjeiro JM. Bone Morphogenetic proteins: promising molecules for bone healing, bioengineering, and regenerative medicine. *Vitamins & Hormones*. 2015;99:293–322.

Carvalho VA, Tosello Dde O, Salgado MA, Gomes MF. Analisi istomorfometrica della matrice di dentina demineralizzata omogenea come materiale osteopromotivo nelle mandibole di coniglio. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2004; 19 : 679–86.

Chen J, Shapiro HS, Sodek J. Development expression of bone sialoprotein mRNA in rat

mineralized connective tissues. *J Bone Miner Res.* 1992; 7:987–997.

Chun YH, Yamakoshi Y, Kim JW, Iwata T, Hu JC, Simmer JP. Porcine SPARC: isolation from dentin, cDNA sequence, and computer model. *Eur J Oral Sci.* 2006; 114(Suppl 1):78–85.

Chen D., Zhao M., Mundy G.R. Bone morphogenetic proteins. *Growth Factors.* 2004 Dec;22(4):233-41.

Chenard KE, Teven CM, He TC, Reid RR. Bone morphogenetic proteins in craniofacial surgery: Current techniques, clinical experiences, and the future of personalized stem cell therapy. *J Biomed Biotechnol* 2012. 2012 601549.

De Oliveira GS, Miziara MN, Silva ER, Ferreira EL, Biulchi AP, Alves JB. Migliore formazione ossea durante il processo di guarigione delle cavità dentarie riempite con matrice di dentina umana demineralizzata. *Aust Dent J.* 2013; 58 : 326–32

Dimitriou, R., Tsiridis, E., & Giannoudis, P. V. Current concepts of molecular aspects of bone healing. *Injury.* 2005;36(12):1392–1404.

Fazzalari N.L. Bone fracture and bone fracture repair. *Osteoporosis International.* 2011; 22, 2003-2006.

Feng JQ, Ward LM, Liu S, Lu Y, Xie Y, Yuan B, Yu X, Rauch F, Davis SI, Zhang S, Rios H, Drezner MK, Quarles LD, Bonewald LF, White KE. Loss of DMP1 causes rickets and osteomalacia and identifies a role for osteocytes in mineral metabolism. *Nat Genet.* 2006 Nov;38(11):1310-5.

Fincham AG, Burkland GA, Shapiro IM. Lipophilia of enamel matrix—a chemical investigation of the neutral lipids and lipophilic proteins of enamel. *Calcif Tissue Res.* 1972; 9:247–259.

Goldberg M, Septier D, Bourd K, Hall R, Jeanny JC, Jonet L, Colin S, Tager F, Chaussain-Miller C, Garabedian M, George A, Goldberg H, Menashi S. The dentino-enamel junction revisited. *Connect Tissue Res.* 2002;43(2-3):482-9

Goldberg M, Septier D, Rapoport O, Iozzo RV, Young MF, Ameye LG. Targeted disruption of two small leucine-rich proteoglycans, biglycan and decorin, exerts divergent effects on enamel and dentin formation. *Calcif Tissue Int.* 2005; 77:297–310.

Goldberg M, Septier D, Oldberg A, Young MF, Ameye LG. Fibromodulin-deficient mice display impaired collagen fibrillogenesis in predentin as well as altered dentin mineralization and enamel formation. *J Histochem Cytochem.* 2006 May;54(5):525-37

Goldberg M, Opsahl S, Aubin I, Septier D, Chaussain-Miller C, Boskey A, Guenet J-L.

Discovery: Sphingomyelin degradation is a key factor in dentin and bone mineralization: lessons from the fro/fro mouse. *J Dent Res.* 2008; 87 :9–13.

Goldberg M, Ono M, Septier D, Bonnefoix M, Kilts TM, Bib Y, Embree M, Ameye L, Young MF. Fibromodulin-Deficient Mice Reveal Dual Functions for Fibromodulin in Regulating Dental Tissue and Alveolar Bone Formation. *Cells Tissues Organs.* 2009; 189:198–202.

Goldberg M, Marian KA, Young M, Boskey A., Dentin: structure, composition and mineralization. The role of dentin ECM in dentin formation and mineralization. *Frontiers Bioscience* E3 2011, January 1; 711e35.

Gomes MF, dos Anjos MJ, Nogueira TO, Guimarães SA. Valutazione istologica della proprietà osteoinduttiva della matrice di dentina demineralizzata autogena su difetti ossei chirurgici nei crani di coniglio utilizzando la membrana amniotica umana per la rigenerazione ossea guidata. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2001; 16 : 563–71.

Gomes MF, dos Anjos MJ, Nogueira Tde O, Catanzaro Guimarães SA. Matrice dentina demineralizzata autogena per applicazioni di ingegneria tissutale: studi radiografici e istomorfometrici. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2002; 17 : 488–97

Gorter de Vries I, Quartier E, Boute P, Wisse E, Coomans D. Immunocytochemical Localization of Osteocalcin in Developing Rat Teeth. *J Dent Res*. 1987; 66:784–790.

Gotliv BA, Veis A. Peritubular dentin, a vertebrate apatitic mineralized tissue without collagen: role of a phospholipid-proteolipid complex. *Calcif Tissue Int*. 2007 Sep;81(3):191-205.

Habelitz S, Balooch M, Marshall SJ, Balooch G, Marshall GW Jr., In situ atomic force microscopy of partially demineralized human dentin collagen fibrils. *J Struct Biol*. 2002 Jun;138(3):227-36.

Hadjidakis, D.J. & Androulakis, I.I. Bone remodeling. *Annals of the New York Academy of Science*. 2006; 1092, 385-396.

Hall R, Septier D, Embury G, Goldberg M. Stromelysin-1 (MMP-3) in forming enamel and predentine in rat incisor – coordinated distribution with proteoglycans suggests a functional role. *Histochemical J.* 1999; 31 :761–770.

Harkness L.S & Bonny A.E. Calcium and vitamin D status in the adolescent: Key roles for bone, body weight, glucose tolerance, and estrogen biosynthesis. *Journal of Pediatric and Adolescent Gynecology.* 2005; 18, 305-311.

Holland PWH, Harper SJ, McVey JH, Hogan BLM. In vivo expression of mRNA for the Ca⁺⁺- binding protein SPARC(osteonectin) revealed by In Situ Hybridization. *J Cell Biol.* 1987; 105:473–482.

Holich M.F. Vitamin D deficiency. *New England Journal of Medicine.* 2007; 357, 266-281.

Huggins C., Wiseman S., Reddi A.H. Transformation of fibroblasts by allogeneic and xenogeneic transplants of demineralized tooth and bone. *J. Exp. Med.* 1970;132:1250–1258.

Inoue T., Deporter D.A., Melcher A.H. Induction of cartilage and bone by dentin demineralized in citric acid. *J Periodontal Res.* 1986 May;21(3):243-55.

In-Woong Um, Young-Kyun Kim and Masaharu Mitsugi, Demineralized dentin matrix scaffolds for alveolar bone engineering, 2017.

Iohara K, Nakashima M, Ito M, Ishikawa M, Nakasima A, Akamine A. Dentin regeneration by dental pulp stem cell therapy with recombinant human bone morphogenetic protein 2. *J Dent Res.* 2004 Aug;83(8):590-5.

Irving JT. Sudanophil inclusions in ameloblasts, odontoblasts and cells of the oral epithelium. *Nature*. 1958; 181:569–570.

Irving JT. A histochemical stain for newly calcified tissues. *Nature*. 1958; 181:704–705.

James AW, LaChaud G, Shen J, Asatrian G, Nguyen V, Zhang X, et al. A Review of the Clinical Side Effects of Bone Morphogenetic Protein-2. *Tissue Eng Part B Rev*. 2016;22(4):284–97.

Kim YK, Kim SG, Byeon JH, Lee HJ, Um IU, Lim SC, et al. Development of a novel bone grafting material using autogenous teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2010; 109:496–503.

Kim YK, Kim SG, Oh JS, Jin SC, Son JS, Kim SY, et al. Analisi del componente inorganico del materiale di innesto osseo di dente autogeno. *J Nanosci Nanotechnol*. 2011; 11 : 7442–5

Kim YK, Lee JK, Kim KW, Um IW, Murata M. Meccanismo di guarigione e applicazione clinica di materiale per innesto osseo di denti autogeni. In: Pignatello R, editore. *Progressi nella scienza dei biomateriali e nelle applicazioni biomediche*. Croazia: Intech Publisher; 2013. pagg. 405–35.

Kim YK, Um IW, Murata M. Sistema di banca dei denti per la rigenerazione ossea - rapporto sulla sicurezza. *J Hard Tissue Biol*. 2014; 23 : 371–6

Koga T, Minamizato T, Kawai Y, Miura K, IT, Nakatani Y, et al. La rigenerazione ossea mediante matrice dentinale dipende dal grado di demineralizzazione e dalla dimensione delle particelle. *PLoS One*. 2016; 11 : e0147235.

Kumar G.S., Orban's Oral Histology & Embryology, casa editrice Elsevier, 2011.

Lang NP, Lindhe J. Parodontologia clinica e implantologia orale-sesta edizione, casa editrice Edi-Ermes, 2016.

Lerner, U.H. Inflammation-induced bone remodelling in periodontal disease and the influence of post menopausal osteoporosis. Journal of Dental Research. 2006; 85, 1007-1017.

Lee du H, Yang KY, Lee JK. Studio suino sull'efficacia dell'osso del dente autogeno nel seno mascellare. J Korean Assoc Oral Maxillofac Surg. 2013; 39 : 120–6.

Lee K.S., Kim H.J., Li Q.L., Chi X.Z., Ueta C., Komori T., Wozney J.M., Kim E.G., Choi J.Y., Ryoo H.M., Bae S.C. Runx2 is a common target of transforming growth factor beta1 and bone morphogenetic protein 2, and cooperation between Runx2 and Smad5 induces osteoblast-specific gene expression in the pluripotent mesenchymal precursor cell line C2C12. Mol Cell Biol. 2000 Dec;20(23):8783-92.

Linde A, Goldberg M. Dentinogenesis. Crit Rev Oral Biol Med. 1993;4(5):679-728.

Lips P, Hosking D., Lippuner K. et al. The prevalence of vitamin D inadequacy amongst women with osteoporosis: an international epidemiological investigation. Journal of Internal medicine. 2006; 260, 245-254.

MacDougall M. J., & Javed, A.. Dentin and Bone: Similar Collagenous Mineralized Tissues. Bone and Development, 2010; 183–200.

Mazzoni A, Papa V, Nato F, Carrilho M, Tjaderhane L, Ruggeri A Jr, Gobbi P, Mazzotti G, Tay FR, Pashley DH, Breschi L. Immunohistochemical and biochemical assay of MMP-3 in human dentine. *J Dent*. 2011 Mar;39(3):231-7.

Mazzoni A, Pashley DH, Tay FR, Gobbi P, Orsini G, Ruggeri A Jr, Carrilho M, Tjaderhane L, Di Lenarda R, Breschi L. Immunohistochemical identification of MMP-2 and MMP-9 in human dentin: correlative FEI-SEM/TEM analysis. *J Biomed Mater Res A*. 2009 Mar 1;88(3):697-703.

McCauley L.K. & Nohutcu R.M. mediators of periodontal osseous destruction and remodelling: principles and implications for diagnoses and therapy. *Journal of Periodontology*. 2002; 73, 1377-1391.

Midura RJ, Vasanji A, Su X, Wang A, Midura SB, Gorski JP. Calcospherulites isolated from the mineralization front of bone induce the mineralization of type I collagen. *Bone*. 2007; 41:1005– 1016.

Moses KD, Butler WT, Qin C. Immunohistochemical study of small integrin-binding ligand, N-linked glycoproteins in reactionary dentin of rat molars at different ages. *Eur J Oral Sci*. 2006 Jun;114(3):216-22.

Murata M. Ingegneria ossea con matrice di dentina demineralizzata umana e BMP-2 umano ricombinante. *J Hard Tissue Biol*. 2005; 14 : 80–1.

Murata M, Sato D, Akazawa T, Taira T, Sasaki T, Arisue M. Bone e induzione della cartilagine in topi nudi mediante matrice di dentina demineralizzata umana. *J Hard Tissue Biol*. 2003; 11 : 110–4

Murata M, Kawai T, Kawakami T, Akazawa T, Tazaki J, Ito K, et al. La dentina insolubile in acido umano con BMP-2 accelera l'induzione ossea nei tessuti sottocutanei e intramuscolari. *J Ceram Soc Jpn*. 2010; 118 : 438–41

Murata M, Akazawa T, Takahata M, Ito M, Tazaki J, Hino J, et al. Induzione ossea del dente umano e dell'osso schiacciata dal mulino automatico di nuova concezione. J Ceram Soc Jpn. 2010; 118 : 434–7

Murata M. Collagen biology for bone regenerative surgery. J Korean Assoc Oral Maxillofac Surg 2012; 38:321 5.

Narayanan K, Gajjeraman S, Ramachandran A, Hao J, George A. DMP-1 regulate Dentin SialoPhosphoProtein gene transcription during early odontoblasts differentiation. J Biol Chem. 2006; 281:19064–19071.

Orgel JP, Irving TC, Miller A, Wess TJ., Microfibrillar structure of type I collagen in situ. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006 Jun 13;103(24):9001-5.

Orimo H. The mechanism of mineralization and the role of alkaline phosphatase in health and disease. J Nippon Med Sch. 2010; 77:4–12.

Papagerakis P, Berdal A, Mesbah M, Peuchmaur M, Malaval L, Nydegger J, Simmer J, Macdougall M. Investigation of osteocalcin, osteonectin, and dentin sialophosphoprotein in developing human teeth. Bone. 2002 Feb;30(2):377-85.

Penttinen MO, Rönkä K, Lassila R, Kovanen PT. The Proteoglycan Decorin Links Low Density Lipoproteins with Collagen Type I. J Biol Chem. 1997; 272:7633–7638.

Pietrzak WS, Ali SN, Chitturi D, Jacob M, Woodell-May JE. BMP depletion occurs during prolonged acid demineralization of bone: characterization and implications for graft preparation. Cell Tissue Bank. 2011;12(2)81–88.

Qin C., Brunn J.C., Cadena E., Ridall A., Butler W.T. Dentin sialoprotein in bone and dentin sialophosphoprotein gene expressed by osteoblasts. *Connect. Tissue Res.* 2003;44:179–183.

Qin C, DSouza R, Feng JQ. Dentin Matrix Protein 1 (DMP1): New and Important Roles for Biomineralization and Phosphate Homeostasis. *J Dent Res.* 2007; 86:1134–1141.

Qin X, Raj RM, Liao XF, Shi W, Ma B, Gong SQ, et al. Utilizzo dell'innesto di dente autogeno rigidamente fissato per riparare il difetto osseo: un modello animale. *Dent Traumatol.* 2014; 30 : 380–4

Raisz, L.G. Clinical practice. Screening for osteoporosis. *New England Journal Medicine.* 2005; 353, 164-171.

Ranly, D.M. Craniofacial growth . *Dental Clinincs of North America.* 2000; 44: 457-470v

Ross M.H. et Pawlina W., *Istologia: testo e atlante, con elementi di Biologia cellulare e molecolare*, casa editrice Ambrosiana, 2010.

Reddi AH, Huggins CB. Influenza della geometria del dente e dell'osso trapiantati sulla trasformazione dei fibroblasti. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1973; 143 : 634–7.

Rijal G., Shin H.I. Human tooth-derived biomaterial as a graft substitute for hard tissue regeneration. *Regen Med.* 2017 Apr;12(3):263-273.

Rittling SR, Matsumoto HN, McKee MD, Nanci A, An XR, Novick KE, Kowalski AJ, Noda M, Denhardt DT. Mice lacking osteopontin show normal

development and bone structure but display altered osteoclast formation in vitro. *J Bone Miner Res.* 1998 Jul;13(7):1101-11.

Roberts T.T., Rosenbaum A.J. Bone grafts, bone substitutes and orthobiologics: the bridge between basic science and clinical advancements in fracture healing. *Organogenesis.* 2012 Oct-Dec;8(4):114-24.

Saito T, Yamauchi M, Abiko Y, Matsuda K, Crenshaw MA. In vitro apatite induction by phosphophoryn immobilized on modified collagen fibrils. *J Bone Miner Res.* 2000; 15:1615–1619.

Schepetkin I. Osteoclastic bone resorption: Normal and pathological. *Annals of the New York Accademy of Science.* 1997; 832, 170-193.

Schmidt-Schultz TH1, Schultz M. Intact growth factors are conserved in the extracellular matrix of ancient human bone and teeth: a storehouse for the study of human evolution in health and disease. *Biol Chem.* 2005 Aug;386(8):767-76.

Schour I. The Neonatal Line in the Enamel and Dentin of the Human Deciduous Teeth and First Permanent Molar. *The Journal of the American Dental Association.* October 1936; Volume 23, Issue 10, Pages 1946-1955.

Sims N.A. & Gooi J.H. Bone remodeling: multiple cellular interactions required for coupling of bone formation and resorption. *Seminars in Cell Developmental Biology.* 200; 19, 444-451.

Sloan AJ, Moseley R, Dobie K, Waddington RJ, Smith AJ. TGF-beta latency-associated peptides (LAPs) in human dentin matrix and pulp. *Connect Tissue Res.* 2002;43(2-3):381-6.

Smith AJ, Matthews JB, Hall RC. Transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) in dentine matrix. Ligand activation and receptor expression. *Eur J Oral Sci.* 1998 Jan;106 Suppl 1:179-84.

Somogyi E, Petersson U, Sugars RV, Hultenby K, Wendel M. Nucleobindin—a Ca –Binding Protein Present in the Cells and Mineralized Tissues of the Tooth. *Calcif Tissue Int.* 2004; 74: 366–376.

Steiglitz BM, Ayala M, Narayanan K, George A, Greenspan DS. Bone Morphogenetic Protein-1/ Tolloid-like proteinases process Dentin Matrix Protein-1. *J Biol Chem.* 2004; 279:980–986.[PubMed: 14578349]

Suzuki T, Lee CH, Chen M, Zhao W, Fu SY, Qi JJ, Chotkowski G, Eisig SB, Wong A, Mao JJ. Induced migration of dental pulp stem cells for in vivo pulp regeneration. *J Dent Res.* 2011 Aug;90(8):1013-8.

Togari K, Miyazawa K, Yagihashi K, Tabuchi M, Maeda H, Kawai T, et al. Rigenerazione ossea mediante matrice demineralizzata di dentina nei difetti cranici dei ratti. *J Hard Tissue Biol.* 2011; 21 : 25–34.

Tomson PL, Grover LM, Lumley PJ, Sloan AJ, Smith AJ, Cooper PR. Dissolution of bio-active dentine matrix components by mineral trioxide aggregate. *J Dent* 2007; 35:636–642.

Waddington RJ, Hall RC, Embery G, Lloyd DM. Changing profiles of proteoglycans in the transition of predentine to dentine. *Matrix Biol.* 2003; 22:153–161.

Wang R, Weiner S. Human root dentin : structural anisotropy and Vickers microhardness isotropy. *Connect Tissue Res.* 1998; 39:269–279.

Wang RZ, Weiner S. Strain-structure relations in human teeth using Moir fringes. *J Biomech.* 1998; 31:135–141.

Wang X., Zhang Q., Chen Z., Zhang L. Immunohistochemical localization of LIM mineralization protein 1 in pulp-dentin complex of human teeth with normal and pathologic conditions. *J Endod.* 2008 Feb;34(2):143-7.

Wu LNY, Genge BR, Kang MW, Arsenault AL, Wuthier RE. Changes in Phospholipid Extractability and Composition Accompany Mineralization of Chicken Growth Plate Cartilage Matrix Vesicles. *J Biol Chem.* 2002; 277:5126–5133.

Yamakoshi Y, Lu Y, Hu JC, Kim JW, Iwata T, Kobayashi K, Nagano T, Yamakoshi F, Hu Y, Fukae M, Simmer JP. Porcine dentin sialophosphoprotein: length polymorphisms, glycosylation, phosphorylation, and stability. *J Biol Chem.* 2008; 283:14835–14844.

Yeomans JD, Urist MR. Bone induction by decalcified dentine implanted into oral, osseous and muscle tissues. *Arch Oral Biol.* 1967;12:999–1008

Zhang J, Tu Q, Chen J. Applications of transgenics in studies of bone sialoprotein. *J Cellular Physiol.* 2009; 220:30–34.

!!!

[Bone Regeneration Using Dentin Matrix Depends on the Degree of Demineralization and Particle Size

