

Università degli Studi di Milano-Bicocca

Tesi di Dottorato in Parodontologia Sperimentale
Ciclo XXVII

NUOVA TECNICA PER LA RIGENERAZIONE DEI TESSUTI: VALUTAZIONI ISTOLOGICHE

Relatore:

Prof. Alessandro Leonida

Candidato:

Dott. Giovanni Todeschini

Matricola: 706333

Anno Accademico

2013-2014

INDICE

1. Embriologia ed anatomia gengivale	6
1.1. Embriologia dei tessuti parodontali	6
1.2. Anatomia gengivale macroscopica	7
1.3. Anatomia gengivale microscopica	9
2. Guarigione dei tessuti	15
2.1. Guarigione dell'alveolo post-estrattivo	15
2.1.1. I processi intra-alveolari	15
2.2. Guarigione dei tessuti molli	18
2.2.1. I processi extra-alveolari	18
3. Rigenerazione dei tessuti	21
3.1. Rigenerazione ossea pre-implantare: basi biologiche	21
3.1.1. Biologia della rigenerazione ossea: la componente vasale	21
3.1.2. Biologia della rigenerazione ossea: la componente cellulare	24
3.2. Rigenerazione ossea pre-implantare: sostituti ossei	31
3.2.1. Fine della rigenerazione ossea	31
3.2.2. Riassorbibilità	32
3.2.3. Innesto osseo ideale	33
3.2.4. L'osso autologo come gold-standard	34
3.2.5. I sostituti dell'osso	36
3.2.6. I sostituti dell'osso: modalità di preparazione	39
3.3. Guided bone regeneration (GBR)	46
3.4. Guided tissue regeneration (GTR)	49
3.4.1. G.T.R.	52
3.4.2. Biocompatibilità (risposta autoimmune, reazione tissutale)	53
3.4.3. Tempo di riassorbimento (caratteristiche istologiche)	54
3.4.4. Mantenimento dello spazio biologico	54
4. Importanza dei tessuti molli per il successo in implantologia	56
5. Rigenerazione e gestione dei tessuti molli	60
6. Le membrane in collagene	65

7. Studio sperimentale	69
7.1 <i>Introduzione</i>	69
7.2 <i>Materiali e metodi</i>	73
7.3 <i>Risultati</i>	79
7.3.1. <i>Campione di tessuto rigenerato</i>	79
7.3.2. <i>Campione tessuto non rigenerato</i>	79
7.4. <i>Discussione</i>	80
7.4.1. <i>Osso</i>	80
7.4.2. <i>Tessuto molle</i>	80
7.5. <i>Conclusioni</i>	81
7.6 <i>Immagini dello studio sperimentale</i>	82
Bibliografia	98

1. EMBRIOLOGIA ED ANATOMIA GENGIVALE

1.1. Embriologia dei tessuti parodontali

Lo sviluppo dei tessuti parodontali (tra cui la gengiva) coincide temporalmente con lo sviluppo degli elementi dentari. Durante lo sviluppo embrionale le cellule della cresta neurale derivanti dal tubo neurale migrano all'interno del primo arco branchiale.

Da qui le cellule si organizzano in una banda, chiamata ectomesenchima, al di sotto dell'epitelio della primitiva cavità orale, detta stomatodeo. Quest'ultimo libera molecole che indirizzano la differenziazione delle cellule della cresta neurale e da qui hanno inizio le interazioni tra epitelio ed ectomesenchima.

Si assiste così alla formazione della lamina dentale e a una serie di processi interni a quest'ultima che portano alla formazione degli elementi dentari (stadio della gemma, del cappuccio e della campana) e parallelamente dei tessuti parodontali.

Durante lo stadio del cappuccio si distinguono una zona detta papilla dentale, che darà origine alla dentina e alla polpa, e una zona detta follicolo dentale, che porterà alla formazione dei tessuti parodontali.

Le cellule epiteliali dell'epitelio dentale esterno ed interno proliferano in direzione apicale, formando un doppio strato cellulare denominato guaina di Hertwig. Dapprima le cellule dell'epitelio interno si differenziano in odontoblasti e iniziano a deporre dentina in direzione centripeta e rilasciano proteine dello smalto.

Durante questo processo la guaina subisce delle fenestrazioni e le cellule del follicolo dentale penetrano e giungono a contatto con la superficie dentinale. Il contatto con le proteine dello smalto induce la differenziazione delle cellule in cementoblasti che depongono sostanza cementoide composta principalmente da

fibre collagene. Le rimanenti strutture dell'organo parodontale sono formate dalle cellule del follicolo dentario poste lateralmente al cemento radicolare che si organizzano in fibroblasti, dando origine al legamento parodontale, o in osteoblasti, dando origine alla bozza primitiva di parte dell'osseo alveolare.

Parte delle cellule mesenchimali rimangono nel loro stato primitivo all'interno dell'apparato maturo e sono quindi responsabili del turnover cellulare che avviene durante tutto l'arco della vita.

1.2. Anatomia gengivale macroscopica

La mucosa orale ricopre tutte le strutture all'interno del cavo orale, fatta eccezione per le corone dentarie, e prosegue senza soluzioni di continuità nella cute delle labbra e nelle mucose del palato molle e della faringe.

All'interno del cavo orale distinguiamo macroscopicamente tre tipologie di mucose con tre funzioni sostanzialmente differenti:

- mucosa masticatoria, corrispondente a gengiva e palato duro;
- mucosa di rivestimento, corrispondente a palato molle, vestiboli superiori ed inferiori, mucosa geniena, pavimento orale e ventre linguale;
- mucosa specializzata, corrispondente al dorso linguale.

La mucosa masticatoria gengivale ricopre il processo alveolare e termina in un margine libero a livello del colletto degli elementi dentari.

È costituita da uno strato epiteliale superficiale e al di sotto di questo vi è uno strato connettivale detto lamina propria.

Coronalmente è delimitata dal margine gengivale libero, che assume la sua forma definitiva al completamento del processo eruttivo e presenta un andamento festonato.

Apicalmente, a livello vestibolare e linguale, prosegue nella mucosa alveolare, dalla quale risulta separata da una linea di demarcazione definita linea (o giunzione) mucogengivale. A livello palatino tale linea non risulta presente, dal momento che la gengiva prosegue senza soluzioni di continuità nella mucosa masticatoria palatina.

Distinguiamo una mucosa masticatoria gengivale libera e una gengiva aderente. Entrambe in condizioni fisiologiche presentano un colorito roseo corallo, una superficie opaca e un aspetto consistente e compatto.

La gengiva libera costituisce la porzione più coronale della struttura gengivale, che circonda il colletto degli elementi dentari oltre alla zona interdentale. La gengiva aderente rappresenta tutta la gengiva rimanente. Tra le due strutture può essere presente una linea di demarcazione, un solco che si approfondisce all'interno del tessuto e che segue l'andamento festonato del margine gengivale libero, definito quindi solco gengivale libero.

Il margine gengivale libero, nella sua porzione più coronale, ha un aspetto arrotondato e tende a riflettersi all'interno in direzione dello smalto, formando una piccola invaginazione (solco gengivale).

Tale solco risulta staccato dalla superficie dentaria, anche se molto ravvicinato, e prosegue apicalmente nell'epitelio giunzionale, una struttura a pochi strati cellulari, che presenta un'adesione blanda allo smalto dentario.

In posizione interprossimale la papilla interdentaria presenta una forma estremamente variabile dipendente dalla posizione degli elementi dentari e dal loro punto di contatto. Tenzionalmente negli elementi anteriori la papilla tende ad essere più pronunciata, mentre nei settori posteriori tende ad essere più appiattita, dando un aspetto meno festonato al margine gengivale. In questi ultimi settori, infatti il punto di contatto è un'area piuttosto estesa ed è situato più apicalmente rispetto ai settori anteriori. La papilla interdentale segue

l'andamento di questa area di contatto, formando una zona al di sotto di quest'ultima definita colle, concava verso l'alto.

La gengiva aderente ricopre il processo alveolare e presenta in superficie moltissime depressioni che le conferiscono il canonico aspetto a buccia d'arancia. È rigidamente fissata al piano sottostante mediante fibre connettivali che la immobilizzano rispetto al piano sottostante (da cui il nome aderente).

Generalmente la gengiva aderente si presenta particolarmente sviluppata nei settori frontali vestibolari mascellari ed esigua nei settori premolari vestibolari mascellari.

L'ampiezza della gengiva aderente, inoltre, tende ad aumentare con l'età, soprattutto a causa del fatto che l'abrasione degli elementi dentari porta ad una continua eruzione durante tutta la vita e l'eruzione porta ad una migrazione coronale dei tessuti gengivali.

1.3. Anatomia gengivale microscopica

La gengiva libera è costituita dall'epitelio e da tutte le strutture connettivale che si trovano coronalmente ad una linea orizzontale immaginaria passante per la giunzione smalto-cemento. L'epitelio che costituisce la gengiva libera è costituito da:

- epitelio orale che si affaccia sulla cavità orale;
- epitelio orale sulculare che si affaccia sull'elemento dentario senza esserne in contatto;
- epitelio giunzionale che determina l'adesione tra l'elemento dentario e la gengiva.

Il confine tra l'epitelio orale ed il tessuto connettivo sottostante è ondulato. Si definiscono papille di tessuto connettivo, le porzioni di tessuto connettivo che si aggettano nell'epitelio e sono separate le une dalle altre dalle creste epiteliali. In condizioni di salute parodontale, queste strutture sono ridotte al confine tra l'epitelio giunzionale ed il tessuto connettivo sottostante.

Riassumendo possiamo affermare che queste digitazioni sono presenti a livello dell'epitelio orale e dell'epitelio orale sulculare, mentre sono ridotte a livello dell'epitelio giunzionale.

L'epitelio che ricopre la gengiva libera, è un epitelio squamoso, stratificato cheratinizzato e, in base al tipo di differenziazione dei cheratinociti, può essere suddiviso nei seguenti strati cellulari: strato basale, strato spinoso, strato granulare, strato cheratinizzato.

I cheratinociti, costituiscono circa il 90% delle cellule presenti nell'epitelio orale; sono presenti anche melanociti, cellule di Langerhans, cellule di Merkel e cellule infiammatorie. Queste cellule spesso sono stellate ed hanno estensioni citoplasmatiche di diverse forme e dimensioni e vengono anche definite "cellule chiare" per il fatto che, nelle sezioni istologiche, la zona intorno al nucleo appare più chiara rispetto ai cheratinociti circostanti.

I melanociti sono cellule sempre presenti. Sono responsabili della secrezione di pigmenti e quindi dell'occasionale pigmentazione della gengiva.

Le cellule di Langerhans hanno funzione di difesa; si ritiene che abbiano un'azione nei confronti degli antigeni che penetrano l'epitelio.

Si ritiene invece che le cellule di Merkel abbiano una funzione sensoriale.

Le cellule dello strato basale sono cilindriche o cuboidali, e sono in contatto con la membrana basale che separa l'epitelio dal tessuto connettivo.

Lo strato basale viene anche definito strato germinativo poiché permette il rinnovo dell'epitelio; può infatti essere considerato il compartimento di cellule germinative dell'epitelio.

Quando dalla divisione cellulare hanno origine due cellule figlie, una cellula basale "vecchia" viene spinta nello strato spinoso; diventando un cheratinocita, inizia ad attraversare i vari strati dell'epitelio.

Un cheratinocita impiega circa un mese ad arrivare allo strato più superficiale dell'epitelio. In condizioni di salute, il numero di cellule che si dividono a livello dello strato basale, corrisponde al numero di cheratinociti che si distaccano dallo strato corneo mantenendo così costante lo spessore epiteliale.

Al microscopio elettronico, spostandoci dallo strato basale al tessuto connettivo sottostante, è possibile osservare prima la lamina lucida, poi, la lamina densa. Dalla lamina densa le fibre di ancoraggio si aggettano a ventaglio nel tessuto connettivo. Le fibre di ancoraggio hanno la lunghezza di circa 1 μm e terminano liberamente nel tessuto connettivo.

Inoltre la membrana cellulare delle cellule epiteliali che sono a contatto con la lamina lucida presenta zone elettrone-dense più spesse intervallate tra loro; queste strutture sono definite emidesmosomi. Gli emidesmosomi garantiscono l'adesione tra l'epitelio e la sottostante membrana basale.

Lo strato spinoso è costituito da 10-20 strati di cellule poliedriche, caratterizzate da un processo citoplasmatico ridotto, simile a spine. Si può osservare che il processo citoplasmatico è ad intervalli regolari e conferisce alla cellula un tipico aspetto punteggiato. L'unione tra le varie cellule è garantita dalla presenza di numerosi desmosomi (coppie di emidesmosomi) oltre che da complessi proteine-carboidrati.

Ogni desmosoma è costituito da una coppia di emidesmosomi uniti tra loro e separati da una zona contenente materiale granuloso elettron-denso.

Riassumendo, i cheratinociti sono sottoposti a un processo di continua differenziazione passando dallo strato basale allo strato corneo. A livello dello strato granulare il cheratinocita non presenta più l'apparato per la sintesi delle proteine e la produzione di energia e si trasforma quindi in una cellula piena di cheratina che si desquama dallo strato corneo distaccandosi dalla superficie dell'epitelio.

Lamina Propria

Il tessuto connettivo rappresenta l'elemento tissutale maggiormente rappresentato della gengiva. È costituito da fibre collagene (60% del volume del connettivo), fibroblasti (5%), vasi e nervi (35%) immersi in una sostanza fondamentale amorfa (matrice).

I diversi tipi cellulari costituenti il tessuto connettivo sono i fibroblasti, mastociti, macrofagi e cellule infiammatorie.

I fibroblasti sono le cellule maggiormente rappresentate nel tessuto connettivo (65%). Sono cellule fusiformi o stellate responsabili della produzione di vari tipi di fibre che si trovano nel tessuto connettivo. Come i mastociti, i fibroblasti sono coinvolti nella sintesi della matrice del tessuto connettivo.

I macrofagi invece svolgono varie funzioni sia fagocitiche che di sintesi.

Oltre ai tipi cellulari appena descritti, il tessuto connettivo contiene cellule infiammatorie di vario tipo. Tra queste abbiamo granulociti neutrofili (detti anche leucociti polimorfonucleati), linfociti e plasmacellule.

Fibre

I fibroblasti sono responsabili della produzione delle fibre del tessuto connettivo.

Si distinguono diversi tipi di fibre: fibre collagene, fibre reticolari, fibre ossitalaniche e fibre elastiche.

- Le fibre collagene sono i costituenti principali del parodonto e sono sintetizzate dai fibroblasti. L'unità essenziale delle fibre collagene è il tropocollagene, sintetizzato all'interno del fibroblasto e poi secreto nello spazio extracellulare. Una volta che si trova nello spazio extracellulare, più fibre di tropocollagene si uniscono longitudinalmente a formare le protofibrille, che unendosi lateralmente tra loro, costituiscono le fibrille collagene. Infine le fibre collagene hanno origine dall'unione di più fibrille collagene. Oltre ai fibroblasti, anche i cementoblasti e gli osteoblasti sono in grado di produrre collagene.
- Le fibre reticolari sono presenti nell'interfaccia tra epitelio e tessuto connettivo.
- Le fibre ossitalaniche sono presenti in scarsa quantità nelle gengiva; sono invece numerose nel legamento parodontale.
- Le fibre elastiche sono presenti invece solo in associazione ai vasi sanguigni sia livello gengivale che del legamento parodontale.

Nella gengiva e nel legamento parodontale, le fibre collagene sembrano distribuite in modo casuale, ma la maggior parte di esse si unisce in gruppi di fasci.

Sono state classificate in base al tipo di inserzione ed in base al loro andamento in fibre circolari, fibre dentogengivali, fibre dentoperiostali, fibre transettali.

- Le fibre circolari decorrono nel contesto della gengiva libera, circondando il dente.
- Le fibre dentogengivali hanno origine dal cemento sopra alveolare e si proiettano a ventaglio all'interno della gengiva libera.
- Le fibre dentoperiostali hanno la stessa origine delle dentogengivali ma si dirigono apicalmente nel contesto della gengiva aderente.

- Infine le fibre transettali si estendono dal cemento sopra-alveolare di due denti adiacenti.

Matrice

La matrice è prodotta principalmente dai fibroblasti; i principali costituenti della matrice del tessuto connettivo sono macromolecole di carboidrati e proteine. I costituenti principali sono proteoglicani e glicoproteine.

La matrice è il mezzo in cui sono contenute le cellule del tessuto connettivo ed è essenziale per il mantenimento delle normali funzioni del connettivo stesso.

2. GUARIGIONE DEI TESSUTI

2.1. *Guarigione dell'alveolo post-estrattivo*

Il processo che porta alla chiusura dell'alveolo a seguito di un'estrazione dentaria è stato oggetto di svariati studi e risulta ben codificato. Infatti esso risulta essere oggetto di studio già dal 1929, e da allora con studi sempre più approfonditi si è dimostrato come il processo di guarigione comporta una serie di fasi, tra cui la formazione e la maturazione del coagulo, l'infiltrazione del coagulo da parte dei fibroblasti e la stabilizzazione della matrice extracellulare ^{1, 2, 3}. Seppur molto studiato, i dati di questi lavori avevano lacune sulle fasi successive della guarigione, compresa la parte di rimodellamento osseo. Studi di Mangos e Almer diedero risposte sulla formazione dei tessuti duri e molli a seguito di una estrazione dentaria ^{4, 5}.

A grandi linee, a 24 ore dall'estrazione, l'alveolo si riempie di coagulo ematico, che nei 2-3 giorni successivi viene gradualmente sostituito da tessuto di granulazione.

Dal quarto giorno, l'epitelio dai margini dell'alveolo inizia a proliferare in modo da coprire il tessuto di granulazione che ha riempito l'alveolo. A partire dalla prima settimana l'alveolo contiene tessuto connettivo immaturo e sul fondo dell'alveolo inizia la deposizione di materiale osteoide.

Quest'ultimo inizia la sua mineralizzazione a partire dalla terza settimana, quando anche l'epitelio ricopre completamente l'alveolo.

A 6 settimane dall'estrazione il tessuto osseo inizia a maturare e possono essere osservate le prime trabecole ossee.

2.1.1. *I processi intra-alveolari*

Immediatamente dopo l'estrazione dentaria, i vasi ematici danneggiati dal trauma riempiono di sangue l'alveolo. Le piastrine interagiscono tra loro e formano un reticolo fibrinico in grado di arrestare il sanguinamento e di formare il coagulo.

Quest'ultimo rappresenta a tutti gli effetti una matrice tridimensionale in grado di guidare la proliferazione e il differenziamento cellulare, oltre a contenere sostanze fondamentali per i seguenti processi di guarigione: fattori di crescita e citochine pro-infiammatorie. Infatti, le citochine (proteine a basso peso molecolare sintetizzate e liberate dalle cellule attive nell'infiammazione e nelle risposte immuni) e i fattori di crescita (polipeptidi che regolano la replicazione, la differenziazione, l'attività e la morte cellulare) sono fattori pro-infiammatori rilasciati dalle piastrine stimolano la migrazione dei granulociti neutrofili, seguiti dai macrofagi, a livello della ferita. In seguito a un meccanismo proteolitico viene attivato il TGF- β . Questo fattore di crescita, rilasciato dalle piastrine attivate, rappresenta un potente mediatore endogeno della riparazione dei tessuti, grazie alla capacità di stimolare la chemiotassi, l'angiogenesi, la deposizione di matrice extracellulare. L'attivazione del TGF- β richiama i neutrofili e i monociti nel sito danneggiato, stimola la proliferazione di fibroblasti e aumenta la produzione di matrice cellulare ⁶.

Le prime fasi di guarigione sono caratterizzate infatti da una detersione della ferita chirurgica, con la diapedesi delle cellule infiammatorie (granulociti polimorfonucleati neutrofili e macrofagi) e la fagocitosi delle cellule batteriche e degli elementi necrotici. I macrofagi, oltre a sostenere la fagocitosi, rilasciano anch'essi citochine e molecole pro-infiammatorie che attraggono e guidano le cellule staminali. Si assiste quindi all'inizio di formazione di nuovi vasi ematici e all'arrivo di cellule staminali mesenchimali dai residui di legamento parodontale e osso alveolare.

Tra il secondo e il terzo giorno inizia il degrado del coagulo attraverso il processo di fibrinolisi.

Si forma quindi tessuto di granulazione, il quale contiene macrofagi e cellule simil-fibroblastiche oltre a numerosi vasi neo-formati. Dopo il settimo giorno il tessuto di granulazione ha completamente infiltrato e rimpiazzato il coagulo. Esso costituisce la base della riparazione in quanto va a riempire la perdita di sostanza. Inoltre, sulla perdita di sostanza, si formerà un primo rivestimento, che costituisce una barriera al passaggio di batteri.

Le cellule simil-fibroblastiche continuano a rilasciare fattori di crescita, proliferano e depositano matrice extracellulare per guidare la diapedesi di nuove cellule, in un processo denominato fibroplasia. Inizialmente, la migrazione e la proliferazione dei fibroblasti avviene attorno alle anse capillari, dove si vede la comparsa di tessuto connettivo giovane, inizialmente povero di fibre collagene, ma ben più ricco di esse durante la fase di maturazione. Questo connettivo inizia a formarsi al livello periferico nell'alveolo verso il quarto giorno per raggiungere il centro, e completare così la sostituzione del tessuto di granulazione, intorno al 20° giorno.

Lungo i vasi in formazione vengono a depositarsi agglomerati di cellule staminali (periciti) che differenziano in direzione osteoclastica e iniziano a depositare matrice ossea composta da fibre collagene disposte in modo intrecciato, il cosiddetto osteone. Talvolta tali cellule rimangono intrappolate all'interno della matrice che loro stessi depongono e formano gli osteociti. All'interno dell'osteone ha inizio il processo di mineralizzazione.

Questo osso primitivo riempie l'alveolo in poche settimane, offrendo uno scaffold stabile e una solida superficie di adesione, oltre a un ampio supporto ematico.

Gli osteoni primari vengono quindi lentamente riassorbiti e sostituiti da osteoni secondari, che compongono osso lamellare e trabecolare.

Un momento fondamentale per la guarigione è la formazione della copertura di tessuto duro dell'alveolo, processo tardivo durante il quale la copertura dell'alveolo, inizialmente composta da osso intrecciato, viene sostituita da osso lamellare che diventa continuo rispetto al piatto corticale dei vicini siti edentuli; questo processo è noto come corticalizzazione.

2.2. Guarigione dei tessuti molli

La guarigione di una ferita è il complesso di manifestazioni reattive che si osservano nella soluzione di continuo di un tessuto e che portano alla rigenerazione e/o alla riparazione di esso. Quando troveremo una totale restitutio ad integrum del tessuto danneggiato, opera della proliferazione degli elementi parenchimali, parleremo di rigenerazione della ferita, mentre quando la sua riparazione sarà affidata all'attività delle cellule connettivali, otterremo come risultato finale una cicatrizzazione.

Il processo riparativo di una ferita può avvenire pertanto in due modi:

- prima intenzione
- seconda intenzione

La guarigione per prima intenzione si otterrà quando il chirurgo riuscirà a far aderire perfettamente, in tutti i piani, i tessuti. Questo è quello che si ottiene dopo la sutura di una ferita chirurgica in sala operatoria dopo un intervento. La giustapposizione dei margini nettamente incisi e l'asepsi assicurano le condizioni ideali per lo svolgersi delle diverse fasi della riparazione dei tessuti. È intuibile come questo tipo di guarigione, oltre a comportare un minor rischio d'infezione dei piani sottostanti, porterà ad una guarigione più breve della ferita chirurgica.

2.2.1. I processi extra-alveolari

A livello mucoso il processo di guarigione è simile.

Come abbiamo già sottolineato a livello mucoso possiamo avere due tipologie di guarigione:

- per prima intenzione, nella quale la perdita di tessuto è trascurabile, i margini sono netti e si giustappongono in modo naturale;
- per seconda intenzione, nella quale la perdita di tessuto è maggiore ed è necessaria la creazione di nuovo tessuto connettivo per permettere la chiusura della ferita.

Questa differenza è esclusivamente didattica e quantitativa, perché i processi alla base sono in parte i medesimi.

La rottura dei vasi all'interno della lamina propria, infatti, produce la fase emorragica e le piastrine provvedono a formare il coagulo secondo i principi già delineati in precedenza. Il coagulo ha le stesse funzioni di scaffold fibrinico descritte per la guarigione dell'alveolo e permette la diapedesi delle cellule infiammatorie che puliscono la ferita.

Dopo 24 - 36 ore ha inizio la fase proliferativa da parte dei fibroblasti e delle cellule endoteliali, con una diminuzione dei granulociti neutrofili e un aumento dei macrofagi. Le anse capillari da un versante della ferita iniziano a proliferare cercando l'anastomosi con le stesse del versante opposto, e le cellule staminali mesenchimali proliferano ai vasi neoformati.

Queste ultime differenziano in senso fibroblastico e iniziano a deporre collagene. Le fibre collagene, inizialmente deposte in modo irregolare, vengono quindi riorganizzate secondo le linee di tensione, andando a formare connettivo maturo.

Dopo 10 giorni il numero di fibroblasti inizia quindi a decrescere, e dalla lamina propria inizia la fase di riepitelizzazione, con la proliferazione dei cheratinociti a partire dallo strato basale.

La guarigione per seconda intenzione è la guarigione tipica dell'alveolo post-estrattivo, nella quale i margini della ferita sono separati e vi è una perdita di sostanza più o meno cospicua.

3. RIGENERAZIONE DEI TESSUTI

3.1. Rigenerazione ossea pre-implantare: basi biologiche

La perdita di tessuto osseo, sia per trauma che per atrofia, può essere così elevata da impedire il posizionamento di impianti osteointegrati. Una delle opzioni del piano terapeutico è la possibilità di intervenire chirurgicamente al fine di ripristinare, almeno in parte, il volume osseo perduto. Questo tipo di intervento ricostruttivo richiede, comunque sia eseguito, che avvenga una rigenerazione del tessuto osseo del paziente.

La rigenerazione di un volume osseo perduto non è un evento spontaneo. Deve essere “innescato” dall’atto chirurgico stesso, che attiva (o dovrebbe attivare) precisi processi biologici.

Nella maggior parte dei casi l’intervento di rigenerazione ossea richiede l’innesto di un materiale biocompatibile, che funga da supporto (scaffold) a vasi e cellule. Il comportamento del biomateriale, una volta innestato, dipende dal tipo di interazione che esso avrà con l’ambiente chimico e biologico in cui esso è posto.

3.1.1. Biologia della rigenerazione ossea: la componente vasale

Il primo evento, fondamentale affinché la rigenerazione ossea possa avere luogo, è l’angiogenesi. Essa avviene per gemmazione di nuovi capillari da vasi pre-esistenti nel tessuto osseo vitale. I nuovi capillari colonizzano il volume da rigenerare sostenendosi o su un coagulo sanguigno o su un biomateriale precedentemente innestato.

L’angiogenesi è mediata da specifici segnali molecolari che agiscono sull’endotelio dei vasi pre-esistenti.

Si tratta di un numero molto elevato di fattori di crescita e proteine, tra i quali ricordiamo, per l'importanza che assumono anche dal punto di vista di indagine biologica e applicazione terapeutica, il Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), o fattore di crescita dell'endotelio vascolare, e il Platelet Derived Growth Factor (PDGF), o fattore di crescita di derivazione piastrinica ^{7,8}.

Per azione di questi segnali molecolari l'endotelio vasale è indotto a proliferare creando degli abbozzi vasali (cosiddetti buds) che diventeranno presto asole (loops). Queste si accresceranno trovando l'opportuno sostegno meccanico all'interno del volume da rigenerare.

3.1.1.1. Angiogenesi e infiammazione

La cascata di segnali molecolari viene attivata da un preciso atto chirurgico, ovvero la preparazione del letto osseo ricevente, sia essa eseguita con raschietto o con fresa a palla. Questa procedura non solo favorisce l'apporto ematico, ma induce una risposta infiammatoria locale. È probabilmente questo processo infiammatorio volutamente provocato, mediato anche dal sistema delle angiotensine che innesca una cascata di meccanismi riparativi tra cui la gemmazione di nuovi vasi ⁹.

3.1.1.2. Angiogenesi e meccanica degli innesti

Come si è detto, la permeazione dei nuovi vasi nel volume che si desidera rigenerare può avvenire solo se in questo è presente una struttura di supporto e sostegno meccanico: un coagulo sanguigno o un biomateriale. I biomateriali abitualmente impiegati sono a blocco (ad esempio, blocchi di osso autologo) o in forma granulare. In entrambi i casi la stabilità dell'innesto gioca un ruolo cruciale: i vasi neo-formati sono capillari estremamente fragili, e qualunque movimento dell'innesto che li sostiene, può romperli. Ne consegue l'importanza di stabilizzare l'innesto correttamente. Se sotto forma di blocco, con opportuni mezzi di osteosintesi, se granulare ponendo i granuli all'interno di sole cavità

contenitive, e istruendo correttamente il paziente sul comportamento post-intervento.

Nel caso degli innesti granulari, inoltre, e quanto più è piccola la granulometria impiegata, è opportuno evitare la compressione eccessiva dei granuli al fine di evitare di superare quella soglia di compattazione che impedirebbe il passaggio dei vasi stessi. Se ciò accadesse, alla riapertura del sito chirurgico si ritroverebbe il materiale (purché esso non fosse solubile) nello stesso stato in cui è stato innestato. Questa condizione, riconoscibile anche perché sono assenti segni di infezione o infiammazione, è detta a volte “Innesto bianco” per sottolineare la mancata irrorazione dell’innesto.

3.1.1.3. Angiogenesi e potenziale rigenerativo dei siti ossei

Il fatto che i nuovi vasi generino dall’osso vitale del paziente a contatto con l’innesto porta ad una logica conseguenza: maggiore è la superficie ossea a contatto con l’innesto, maggiore è la probabilità che la rigenerazione abbia successo. In altri termini, la quantità di superficie ossea a contatto con l’innesto e la probabilità di successo della rigenerazione ossea sono due grandezze correlate positivamente (al crescere dell’una aumenta l’altra).

Al contrario, il volume da rigenerare è correlato con la probabilità di successo della rigenerazione in modo negativo: maggiore è il volume da rigenerare, meno probabile è il successo dell’evento rigenerativo.

I due fattori possono idealmente essere combinati assieme nel rapporto tra superficie ossea a contatto con l’innesto e volume innestato, che possiamo definire come potenziale rigenerativo del sito di innesto.

Quantificare matematicamente questa grandezza per ogni caso si presenti non è probabilmente molto utile (altri fattori paziente-dipendenti concorreranno poi al risultato finale), tuttavia essa deve essere presa come riferimento per poter prevedere, almeno in parte, l’esito finale della rigenerazione.

Il potenziale rigenerativo di un sito osseo, inoltre, potrà dare indicazioni sulla scelta di un biomateriale in funzione della sua cinetica di riassorbimento, nell'intento di allineare quest'ultima a quanto si suppone avverrà nel sito innestato: un sito a potenziale rigenerativo ridotto richiederà un biomateriale a riassorbimento lento, mentre per un sito a potenziale rigenerativo elevato potrà essere sufficiente un biomateriale a riassorbimento rapido (o anche nulla, come è il caso dei piccoli alveoli post-estrattivi a pareti integre in cui è lo stesso coagulo ad agire da scaffold).

3.1.2. Biologia della rigenerazione ossea: la componente cellulare

3.1.2.1. Cellule mesenchimali e morfogenesi

I vasi che colonizzano il sito innestato avranno, a rigenerazione completata, la funzione di assicurare l'apporto di ossigeno e nutrienti al tessuto rigenerato. Nelle prime fasi della rigenerazione, essi svolgono anche l'importante funzione di veicolare elementi cellulari nel sito di innesto. Tra questi, i primi elementi ad apparire sono cellule mesenchimali ¹⁰. Si tratta di cellule multipotenti, sempre presenti nel circolo ematico, che possono differenziarsi, a seconda dell'ambiente biochimico in cui si trovano, in fibroblasti, se si trovano nel tessuto connettivo, o in osteoblasti se si trovano nel tessuto osseo.

Gli osteoblasti appaiono, nelle usuali istologie ematossilina eosina, come piccole cellule mononucleate disposte in una lunga fila di singole cellule connesse tra loro, adiacenti a trabecole ossee in fase di accrescimento.

Studi ultrastrutturali hanno dimostrato che osteoblasti adiacenti mettono in comunicazione i rispettivi citoplasmi attraverso gap junctions, permettendo così lo scambio di segnali intracellulari di coordinazione della loro azione di produzione di nuova matrice ossea ¹¹.

Gli osteoblasti, dopo avere svolto la loro azione, possono andare incontro a tre destini differenti: divenire osteociti, morire per apoptosi, o divenire lining cells quiescenti. Queste si dispongono sulla superficie delle ossa adulte ove svolgono

funzioni di regolazione dei flussi ionici e possono rappresentare un “serbatoio” cellulare di osteoblasti e, ultimo ma non meno importante, possono essere parte del complesso meccanismo di percezione delle deformazioni meccaniche che vede coinvolti gli stessi osteociti ¹².

Anche il processo morfogenetico è mediato da numerosi segnali molecolari ¹³. Il loro effetto finale, più che dipendere dalla presenza o assenza di una data molecola è definito dal rapporto reciproco delle concentrazioni di ciascun fattore. Risulta quindi fuorviante attribuire ad un particolare fattore di crescita un ruolo chiave nella morfogenesi (e per riflesso nella rigenerazione).

Tra i fattori di crescita più studiati (anche per le possibili applicazioni terapeutiche) ricordiamo comunque le Bone Morphogenetic Proteins (BMPs), o proteine morfogenetiche dell’osso (in particolare, la BMP2 e la BMP7).

3.1.2.2. Gli osteoblasti e la deposizione del collagene

La cellula mesenchimale quiescente che si trasforma in osteoblasto subisce evidenti modificazioni ultrastrutturali. In particolare, lo stroma cellulare diviene quasi completamente occupato dal reticolo endoplasmatico rugoso, a dimostrazione dell’intensa attività di sintesi proteica esercitata da questo tipo cellulare.

L’azione principale degli osteoblasti è infatti la produzione di collagene (principalmente di tipo I), ovvero di molecole di procollagene che sono secrete nello spazio extracellulare dove, dopo avere subito alcune modificazioni post-traduzionali, si aggregano in fibrille, dando origine alle molecole di collagene maturo ¹⁴. Le fibrille a loro volta si aggregano in fibre di dimensioni maggiori.

L’aggregazione delle fibrille è spontanea, anche se la morfologia strutturale finale della fibra di collagene è regolata dall’interazione, in fase di aggregazione, con altri fattori proteici ancillari ^{15, 16}.

La fibra di collagene è caratterizzata, essendo formata da sub-unità identiche disposte uniformemente nello spazio, da una spiccata e caratteristica regolarità

che le conferisce la caratteristica striatura trasversale visibile in microscopia elettronica a trasmissione, e la rende birifrangente quando illuminata con luce polarizzata.

La regolarità spaziale della fibra di collagene gioca un ruolo determinante nella sua stessa mineralizzazione. Si ritiene infatti che il punto di giunzione testa-coda tra due molecole di procollagene sia anche il punto di nucleazione (cioè, di prima formazione) dei cristalli di apatite ossea. Tale fenomeno di nucleazione di cristalli guidata spazialmente da una struttura regolare cristallina o paracristallina (come è il collagene) viene definito epitassia e, nel caso del collagene osseo e dell'apatite ossea, è stato dimostrato attraverso analisi diffrattometriche ¹⁷.

Il collagene osseo, oltre a permettere la nucleazione fisica dei cristalli di apatite, modula altri processi biologici che sottendono alla rigenerazione ossea. Elenchiamo di seguito i più importanti: interagisce con la sub-unità beta1 delle integrine della superficie cellulare degli osteoblasti e osteoclasti, favorendo l'adesione delle cellule al materiale innestato ¹⁸; agisce come coattivatore necessario all'azione delle proteine morfogenetiche (BMPs), favorendo l'azione stimolativa dei fattori di crescita endogeni ¹⁹; lega i fattori di crescita solubili convertendoli in fattori insolubili: li protegge così dalla proteolisi e ne aumenta l'emivita, prolungando la durata della stimolazione rigenerativa ²⁰; regola l'accesso dei fattori extracellulari al cristallo osseo in via di formazione, modulando fisiologicamente la mineralizzazione ossea ²¹; modula la trasduzione del segnale di proliferazione e differenziamento nelle cellule osteoblastiche, regolando il processo di rimodellamento ²²; interagisce con le cellule mesenchimali provenienti dal midollo osseo, inducendone l'adesione, la proliferazione ed il differenziamento in osteoblasti ²³; promuove la rigenerazione ossea quando innestato in difetti ossei, esercitando un'azione pro rigenerativa diretta ^{24, 25}; stimola a livello osteoblastico l'espressione degli stessi

geni codificanti per il recettore II delle BMP, rendendo più sensibili le cellule ai segnali rigenerativi ²⁶.

3.1.2.3. *Gli osteociti*

All'interno della matrice ossea mineralizzata si rinvengono numerosi osteociti, che sono la tipologia cellulare più rappresentata del tessuto osseo (nel tessuto osseo adulto il loro numero è circa 10 volte maggiore di quello degli osteoblasti) ²⁷. Un osteocita deriva da un osteoblasto che ha subito un ulteriore differenziamento, anche se il meccanismo con cui questo avviene è allo stato attuale sconosciuto ²⁸.

L'osteocita, che risiede nelle tipiche lacune osteocitarie, è una cellula stellata. Possiede infatti lunghi e sottili prolungamenti cellulari che raggiungono altri osteociti adiacenti, con cui formano gap junctions che pongono i rispettivi citoplasmi in comunicazione fra loro.

Di fatto quindi, la rete di prolungamenti cellulari giunge a permeare tutta la matrice mineralizzata, realizzando quello che viene definito il network osteocitario (si stima che vi siano circa diecimila osteociti per millimetro cubo, e che ciascun osteocita possieda mediamente 50 prolungamenti cellulari) ²⁹. Tale network rappresenta da un lato un'area estremamente estesa di contatto tra cellule e matrice mineralizzata (si calcola che l'estensione di tale area sia approssimativamente 100 volte maggiore di quella di contatto tra osso ed osteoblasti e lining cells assieme), e dall'altro un sistema di comunicazione estremamente ramificato ed esteso tra diverse parti dell'osso, e tra l'interno dell'osso e la sua superficie ³⁰.

Allo stato attuale, le funzioni attribuite al network osteocitario sono essenzialmente due: un ruolo nella regolazione dell'omeostasi della calcemia e della fosfatemia (modulando il rilascio o l'accumulo dei due ioni nell'osso), e, con maggiore importanza, il ruolo di costituire una rete mecano-sensoria in grado di percepire le deformazioni statiche e dinamiche cui l'osso è sottoposto

e, tramite la modulazione dell'attività osteoblastica e osteoclastica attraverso segnali paracrini, di regolarne il rimodellamento per permettere l'adattamento morfologico e strutturale agli stimoli meccanici esterni ³¹. Si è osservato infatti che gli osteoblasti sono reclutati nelle aree dove gli osteociti sono sottoposti a carico, mentre gli osteoclasti (le cellule deputate al riassorbimento osseo) sono reclutati là dove gli osteociti sono sottoposti a stress meccanico minore ³².

3.1.2.4. Gli osteoclasti e il rimodellamento osseo

La matrice ossea mineralizzata è in continuo rimodellamento, cioè in continua e concomitante costruzione e demolizione. La presenza di questo processo nell'adulto è quello di preservare la resistenza meccanica dell'osso, rimuovendo al contempo l'osso danneggiato ³³. L'attività di rimodellamento nel suo complesso è eseguita da un complesso multicellulare, definito anche BMU (Basic Metabolic Unit, o Unità Metabolica di Base), che comprende gli osteoblasti – deputati alla produzione della matrice collagenica destinata a mineralizzarsi, gli osteociti – destinati ad agire come regolatori del rimodellamento stesso, e gli osteoclasti – le cellule destinate alla degradazione delle componenti minerali e non minerali dell'osso ³¹.

Gli osteoclasti sono cellule giganti multinucleate che si sviluppano per differenziamento di cellule ematopoietiche della linea monocito-macrofagica. Recenti studi hanno evidenziato come il loro stesso differenziamento, nonché la loro successiva azione, dipendano da segnali di origine osteoblastica ed osteocitica a conferma ulteriore dell'azione strettamente coordinata della BMU ³¹.

L'osteoclasto è l'unica cellula di mammifero in grado di assorbire la matrice mineralizzata, attraverso un processo detto ciclo di assorbimento. Questo prevede:

- l'adesione della cellula alla matrice mineralizzata
- la formazione di un sigillo ermetico tra la membrana cellulare e la matrice

- il differenziamento morfologico e funzionale della porzione di membrana compresa nel sigillo che secerne nello spazio sottostante enzimi e protoni (acidificandolo) che portano e) alla lisi della matrice sottostante.
- infine il distacco della cellula ed, eventualmente, la sua morte per apoptosi.

Il primo evento, ed evento chiave senza il quale il riassorbimento non può avere luogo, è l'adesione della cellula alla matrice. Tale adesione è mediata da integrine di superficie, proteine della membrana osteoclastica in grado di interagire con proteine della matrice (non ultimo il collagene stesso), favorendo l'adesione della cellula ³⁴.

L'interazione delle integrine con le proteine della matrice crea una riorganizzazione del citoscheletro cellulare, soprattutto a carico dei filamenti di actina, che si organizzano in un anello (actin ring), che definisce la zona del sigillo (sealing zone) ³⁵.

L'osteoclasto lisa quindi la componente minerale della matrice mineralizzata inducendo (attraverso l'esocitosi di vescicole intracellulari e l'azione di pompe protoniche) un significativo abbassamento del pH nel volume sottostante ³⁶.

L'adesione della membrana alla matrice ossea crea al di sotto della cellula un volume isolato dal fluido extracellulare, col quale non sono più possibili scambi di molecole per diffusione, e questo permette che il pH possa essere mantenuto ai bassi valori necessari allo scioglimento dell'apatite ossea.

La membrana cellulare al di sopra della zona di lisi subisce altre modificazioni strutturali, invaginandosi a formare microvilli che le danno il caratteristico aspetto a "orletto increspato" (ruffled border). Questa conformazione ha lo scopo di aumentare la superficie attiva di esocitosi delle vescicole e di pompaggio di protoni, permettendo una più rapida ed efficace acidificazione del volume sottostante.

Gli osteoclasti sono in grado di degradare di seguito anche la matrice organica attraverso l'azione di metallo-proteasi , di altre proteasi lisosomiali e di altri fattori ancillari ^{37, 38}.

È interessante notare come gli osteoclasti siano anche dotati di motilità: attraverso un movimento di tipo ameboide (permesso da modificazioni intracellulari del citoscheletro), infatti, essi sono in grado di digerire sequenzialmente porzioni adiacenti di tessuto osseo, a volte rendendo visibile la matrice organica non degradata, lasciando sulle superfici ossee vere e proprie tracce del loro passaggio (resorption trails) ³⁹.

3.2. Rigenerazione ossea pre-implantare: sostituti ossei

La rigenerazione ossea richiede quasi sempre che sia innestato un biomateriale che funga da sostegno meccanico a cellule e vasi (che abbia cioè effetto osteoconduttivo). Unica eccezione sono i siti ossei a potenziale rigenerativo così elevato da far supporre che il semplice coagulo sanguigno sia uno scaffold sufficiente. Questo nella pratica si riduce ai soli alveoli post estrattivi, integri, di piccoli elementi monoradicoliati.

3.2.1. Fine della rigenerazione ossea

La scelta del biomateriale “corretto” da innestare dipende da molteplici fattori. Primo fra tutti è il fine ultimo che si vuole ottenere dall'intervento di rigenerazione ossea. Distingueremo infatti due finalità differenti:

- la rigenerazione ossea in senso stretto, ovvero l'ottenimento di un volume osseo vitale e funzionale, idealmente privo di materiale estraneo, lì dove vi era una perdita dovuta a trauma o atrofia
- la preservazione di un volume osseo da un futuro riassorbimento nel tempo.

Nel secondo caso, infatti, l'ottenimento nell'intero volume innestato di solo osso del paziente diventa un obiettivo secondario rispetto quello del mantenimento del volume stesso. In questo caso la scelta del materiale sarà orientata verso un materiale biocompatibile, ma per nulla o scarsamente riassorbibile: che mantenga cioè il volume innestato il più a lungo possibile, pur integrandosi con l'osso di neo-formazione.

Il primo caso, invece, richiede che il materiale innestato non sia solo biocompatibile ma abbia caratteristiche ulteriori, che permettano la sua sostituzione, completa e nei tempi corretti, con il tessuto osseo neo-formato del paziente.

3.2.2. Riassorbibilità

Nel caso si voglia ottenere la completa sostituzione del materiale innestato con il tessuto osseo di neo-formazione del paziente, risulta evidente che il materiale stesso deve essere completamente riassorbibile (pena il permanere di particelle esogene indesiderate).

Il termine “riassorbibile” è peraltro di per sé poco significativo, se non è indicato anche il meccanismo di riassorbimento. Il riassorbimento di materiali diversi può infatti avvenire attraverso diversi meccanismi:

- *Idrolisi diretta da parte dell'acqua*: si tratta di un meccanismo molto rapido che riguarda tipicamente i materiali di natura salina (come, ad esempio, il solfato di calcio). Il dipolo ionico dell'acqua interagisce con gli atomi del sale ionizzandoli e portandoli in soluzione.
- *Idrolisi catalizzata da enzimi*: la reazione chimica è la stessa descritta al punto precedente: la solubilizzazione di parti della molecola da parte dell'acqua. A causa della natura del legame chimico della molecola di cui è composto il materiale, questa reazione ha un'energia di attivazione così alta che essa non avviene nelle condizioni fisiologiche. In presenza di un enzima, invece, l'energia di attivazione si abbassa a tal punto che la reazione può avvenire in modo quantitativamente osservabile. È il caso, ad esempio, delle membrane in collagene che, pur non sciogliendosi in acqua, una volta innestate sono degradate ad opera delle collagenasi, enzimi idrolitici presenti nel tessuto connettivo.
- *Fagocitosi*: è il caso di piccoli frammenti di qualunque materiale (indicativamente di diametro inferiore ai 0.2 mm). Sotto questa soglia viene attivata la reazione macrofagica, per cui il materiale è endocitato e poi disciolto all'interno del macrofago.
- *Degradazione osteoclastica (e sostituzione)*: è il caso di un materiale che possa essere riconosciuto dagli osteoclasti (i quali devono potervi aderire), che sia

solubile in ambiente acido, e che possa essere sostituito da tessuto osseo del paziente.

Dei quattro meccanismi descritti, solo l'ultimo prevede l'interazione reale del materiale con il metabolismo di turnover osseo cellula-mediato. Materiali di questo tipo dovrebbero essere definiti, piuttosto che "riassorbibili", rimodellabili.

Il fatto che sussistano differenti meccanismi di riassorbimento pone un problema di rilevante importanza ai fini della rigenerazione ossea, in quanto implica che – anche se un materiale è classificato come "riassorbibile" - di fatto materiali diversi possano esibire cinetiche di riassorbimento estremamente variabili in funzione del meccanismo implicato nella loro degradazione.

In altri termini, e in relazione alla tipologia di materiale utilizzato e al potenziale rigenerativo del sito osseo oggetto di rigenerazione la cinetica di riassorbimento del materiale prescelto può non essere adeguata. Il caso peggiore si ha, chiaramente, quando il materiale sparisce troppo rapidamente: in questo caso una parte del volume innestato non sarà permeato da vasi e cellule e la rigenerazione sarà di volume ridotto; nel caso in cui il materiale permanga troppo a lungo, invece, può darsi il caso in cui l'inserimento implantare avvenga in una miscela di osso neo-formato e biomateriale, una condizione che non rappresenta la condizione ottimale ai fini dell'osteointegrazione dell'impianto stesso: i punti di contatto tra biomateriale inerte e impianto sono punti in cui l'osteointegrazione non può avvenire, e la biomeccanica della zona innestata non è quella dell'osso nativo.

3.2.3. Innesto osseo ideale

Le due caratteristiche principali di un innesto osseo ideale, per quanto appena detto, dovrebbero dunque essere:

- La biocompatibilità: L'innesto osseo non deve generare alcuna reazione da corpo estraneo.
- La rimodellabilità in tempi fisiologici: l'innesto osseo dovrebbe essere degradato (previa l'opportuno riconoscimento) solo da parte degli osteoclasti. Contemporaneamente, dovrebbe essere sostituito con osso endogeno neo-formato del paziente. Solo se questo accade, infatti, la sua sostituzione avverrà con la stessa cinetica di quanto accade nell'ambiente osseo circostante.

A queste due caratteristiche potremmo aggiungere dei desiderata:

- La capacità stimolativa.

L'innesto osseo dovrebbe possedere idealmente la capacità di indurre (o perché caricato con fattori di crescita, e/o per sue caratteristiche fisico-chimiche) almeno alcuni dei fenomeni biologici sottesi alla rigenerazione ossea, come l'angiogenesi o la morfogenesi.

- L'osteogenicità diretta.

L'innesto osseo dovrebbe possedere già al suo interno, o miscelate assieme, cellule osteoblastiche differenziate (o almeno mesenchimali multipotenti) in grado di produrre già nuovo tessuto osseo, o di differenziarsi in osteoblasti attivi.

3.2.4. L'osso autologo come gold-standard

Risulta evidente che l'unico materiale che possiede le caratteristiche appena elencate è l'osso autologo, ovvero quello prelevato dal paziente stesso. È certamente biocompatibile e rimodellabile, ed inoltre contiene, almeno in concentrazioni fisiologiche, fattori di crescita e cellule attive.

Come è noto, tuttavia, l'impiego dell'osso autologo nella pratica clinica presenta degli svantaggi: la necessità di un secondo sito chirurgico, con aumento della morbidità per il paziente; nel caso di prelievi da sedi extraorali

(ad esempio, da cresta iliaca) la necessità di operare in strutture adeguatamente attrezzate, con conseguente aumento di tempi e di costi e, non ultimo, la possibile scarsa accettazione da parte del paziente.

Infine, l'osso autologo presenta il problema del riassorbimento post-innesto, che in taluni casi può raggiungere anche il 40-50% del volume innestato.

Si è speculato sulla correlazione tra il meccanismo fetale di formazione dell'osso prelevato e l'entità del suo riassorbimento. Più ragionevole appare ritenere che la perdita volumetrica sia dovuta principalmente al fatto che dal momento del prelievo al momento dell'innesto intercorre un intervallo di tempo in cui il tessuto prelevato si trova in condizioni di mancanza di ossigeno e gli elementi cellulari in esso presenti muoiono. Al momento dell'innesto sono di conseguenza impiantate porzioni di tessuto necrotico, che attivando una reazione macrofagica innescano un meccanismo di riassorbimento dell'innesto stesso. Il fenomeno è maggiore all'aumentare del volume prelevato, e se l'innesto presenta ampie zone di osso spongioso, più ricco in elementi cellulari e meno denso dell'osso corticale. L'osso corticale (ad esempio, da calvaria) si riassorbirebbe in grado minore in virtù della minore componente cellulare e della sua maggiore densità.

Il riassorbimento dell'osso autologo è quasi certamente la causa dei risultati di alcune indagini retrospettive comparative su innesti nel seno mascellare con osso autologo o eterologo (di mammifero), o miscele dei due, e inserimento di impianti in due tempi, dove i diversi materiali sono stati valutati in funzione del successo implantare a lungo termine; la percentuale di fallimento implantare è significativamente maggiore quando gli innesti sono eseguiti con solo osso autologo ^{40, 41, 42}.

La possibilità di usare osso omologo o derivati è regolata nell'Unione Europea dalle Banche dei Tessuti, enti cui è demandato l'obbligo di raccogliere e fornire questa tipologia di biomateriali. I dati relativi all'efficacia di tali innesti sono

positivi, anche se la disponibilità di questo tipo di innesti permane limitata per la scarsità dei donatori e il loro utilizzo può incontrare il rifiuto da parte del paziente, costringendo nuovamente a ripiegare su biomateriali ^{43, 44}. Bisogna inoltre ricordare che le procedure di conservazione di questi materiali, sebbene ampiamente testate, nel caso dell'osso omologo congelato a fresco non prevedono alcun trattamento di sterilizzazione, probabilmente perché l'irraggiamento di materiale contenente ancora lipidi provoca la formazione di radicali citotossici indesiderati ^{45, 46, 47}.

3.2.5. I sostituti dell'osso

I limiti appena descritti dell'osso autologo e dell'osso omologo hanno fatto sì che attualmente siano impiegati diversi biomateriali sostitutivi. Il loro impiego ha diversi vantaggi (non ultimo quello della disponibilità illimitata). È doveroso tuttavia sottolineare che allo stato attuale tutti i sostituti dell'osso sono solo in grado di esercitare un effetto osteoconduttivo, agendo cioè solo da sostegno meccanico per vasi e cellule, a differenza dell'osso autologo che possiede almeno in parte, come si è visto, anche un certo potere di osteoinduzione (per la presenza di fattori di crescita) e di osteogenesi (per la presenza di cellule differenziate attive).

I sostituti dell'osso attualmente impiegati possono essere classificati in tre distinte famiglie, a seconda della loro origine:

- sintetici
- naturali, non di origine ossea
- naturali di origine ossea

I sostituti ossei sintetici:

I sostituti dell'osso sintetici sono ottenuti attraverso processi di sintesi chimica, e possono essere sia riassorbibili che non riassorbibili. Per ora nessun

biomateriale di origine sintetica riassorbibile si è dimostrato capace di subire un vero e proprio rimodellamento osteoclastico, allineandosi alla cinetica di rimodellamento del sito di innesto.

Una breve panoramica dei biomateriali per rigenerazione ossea di origine sintetica può comprendere

- Il solfato di calcio (o gesso di Parigi): si tratta di un sale che si scioglie direttamente in ambiente acquoso. Data la sua costante di solubilità, esso sparisce nell'arco di 4-6 settimane.
- Il fosfato di calcio e derivati: si tratta di un gruppo eterogeneo di materiali che esibiscono diverse proprietà di riassorbimento dipendenti dalla disposizione e dal numero di legami chimici nella molecola. Il loro riassorbimento è in parte dovuto ad idrolisi, in parte a rimaneggiamento cellulare, ed è solitamente rapido (2-3 mesi).
- L'idrossiapatite sintetica (HA). Si tratta di un materiale scarsamente o per nulla riassorbibile ⁴⁸. Esercita peraltro un ottimo effetto osteoconduttivo, osteointegrandosi con il tessuto osseo neoformato.
- I biovetri. Anche i biovetri sono materiali scarsamente o per nulla riassorbibili, in grado di legarsi al tessuto osseo neoformato ⁴⁹. Esistono studi che dimostrano che la loro superficie è resistente all'attività osteoclastica, confermando come la loro scarsa riassorbibilità derivi dall'impossibilità per l'osteoclasto di eseguire il ciclo di riassorbimento completo (adesione, sigillo, acidificazione, distacco) ⁵⁰. Probabilmente lo stesso vale per le idrossiapatiti sintetiche.
- I derivati dell'acido poliglicolico. Hanno un riassorbimento generalmente lento, per idrolisi diretta, e correlato col grado di densità del composto ⁵¹.

I sostituti naturali di origine non ossea:

Tra questi materiali citiamo i derivati da coralli (Biocoral), anche se attualmente il loro uso è molto limitato. Si tratta di aragoniti calcifiche, chimicamente classificabili come derivati del carbonato di calcio, che mostrano un riassorbimento molto lento, se non assente ⁵².

I sostituti naturali di origine ossea:

Come si è visto, i biomateriali di origine sintetica riassorbibili sono degradati attraverso meccanismi che, anche nel migliore dei casi, sono solo parzialmente cellula-mediati. La loro cinetica di degradazione non dipende quindi dalle condizioni biologiche del sito di innesto, ma solo dalle condizioni chimico-fisiche (ambiente acquoso, pH neutro, temperatura di 37 °C, concentrazione salina fisiologica etc..). Abbiamo invece visto che, in funzione del potenziale rigenerativo del sito osseo, ci si può attendere che la cinetica della rigenerazione ossea dipenda in modo significativo dalle condizioni anatomiche del sito stesso. Questa discrepanza, si è visto, può rappresentare un problema in quanto può condurre a rigenerazioni difettive (se il materiale si degrada prima che la rigenerazione sia completa) o al permanere di particelle indesiderate.

Per cercare di realizzare dei biomateriali che, invece, siano rimodellabili, ovvero si degradino per via osteoclastica e quindi presentino una cinetica di riassorbimento maggiormente allineata, se non identica a quella del sito di innesto, negli ultimi 15 anni sono stati sviluppati sostituti ossei ricavati da osso di specie di mammifero diverse dall'uomo, cioè sostituti ossei eterologhi.

Il razionale di questa scelta consiste nel fatto che la componente minerale ossea di mammifero non presenta sostanziali differenze tra specie diverse, né per composizione chimica né per struttura trabecolare, al di là della variabilità dovuta al peso dell'animale ⁵³.

Ipotizzando di essere in grado di eliminare efficacemente la componente organica antigenica dall'osso di una qualunque specie di mammifero diversa dall'uomo (ad esempio, bovina, suina, equina), la rimanente parte minerale dovrebbe non solo essere biocompatibile, in quanto priva di antigeni, ma anche riassorbibile per via osteoclastica, ovvero rimodellabile. Teoricamente, infatti, la Basic Metabolic Unit non dovrebbe essere in grado di distinguere questa componente minerale da quella endogena.

Il problema diviene quindi identificare un metodo di deantigenazione efficace, che sia in grado di eliminare la componente antigenica, ma senza alterare le proprietà della rimanente parte minerale che si vogliono preservare.

3.2.6. I sostituti dell'osso: modalità di preparazione

3.2.6.1. Deantigenazione chimica o chimico-fisica

La deantigenazione chimica o chimico-fisica si basa sull'utilizzo di reagenti chimici (solventi organici) per sciogliere la componente organica antigenica. I reagenti sono solitamente impiegati in apparati che ne facilitano la penetrazione all'interno dell'osso applicando forti pressioni positive, o forti pressioni negative (per aspirazione), a cui seguono fasi di lavaggio ed inattivazione dei reagenti. Il rischio intrinseco di questo tipo di tecnologia è la non efficace rimozione dei reagenti dall'innesto (i solventi organici tendono ad adsorbirsi sull'apatite ossea, e il loro allontanamento diviene molto complesso). Materiali di questo tipo sono comunque attualmente impiegati per applicazioni odontoiatriche ⁵⁴.

3.2.6.2. Deantigenazione termica

La deantigenazione termica si basa sull'impiego di temperature talmente elevate (>600°C) da causare la sublimazione delle sostanze organiche senza la formazione di ceneri sul materiale trattato. Si tratta di un metodo estremamente

efficace ed alla base del processo di fabbricazione dell'innesto eterologo attualmente più utilizzato (osso bovino deproteinizzato, o Bio-oss (Geistlich)).

Il trattamento termico, tuttavia, causa delle alterazioni significative del materiale d'origine. La prima consiste nella perdita di resistenza meccanica, dovuta al fatto che, così come avviene per le altre proteine, anche il collagene osseo è eliminato dalle alte temperature applicate. L'osso perde quindi la resistenza elastica e diviene friabile a tal punto che è impossibile ricavare, con questo processo, blocchi ossei resistenti alla compressione o alla foratura, o al fissaggio con mezzi da osteosintesi (rendendo di fatto impossibile l'impiego di questo materiale per qualunque intervento in Ortopedia dove la resistenza al carico è spesso necessaria).

La seconda alterazione riguarda invece le proprietà biologiche del materiale, la cui cinetica di assorbimento risulta fortemente rallentata, tanto che a distanza di 10 anni dall'innesto si può ritrovare ancora circa il 13% di materiale non riassorbito ⁵⁵. Anche tale modificazione della cinetica di degradazione del materiale è presumibilmente dovuta al trattamento termico cui è sottoposto l'osso bovino. Indagini in microscopia elettronica mostrano, rispetto a granuli d'osso trattati con metodi più blandi, una superficie del granulo più "polverosa", ed immagini in microscopia ottica di sezioni di granuli colorate con ematossilina eosina mostrano un aspetto fortemente dissimile da quello dell'osso naturale.

Un recente studio ha dimostrato come l'adesività osteoclastica su questo materiale sia ridotta rispetto a quella su osso bovino non trattato ⁵⁶. L'adesione osteoclastica parzialmente compromessa potrebbe quindi rendere conto dell'alterata cinetica di rimodellamento osservata per questo materiale.

3.2.6.3. Deantigenazione enzimatica

La deantigenazione enzimatica si basa sull'impiego di enzimi digestivi (lipasi, proteasi, altre idrolasi), e si attua attraverso l'immersione di sezioni ossee in

soluzioni acquose polienzimatiche, mantenute a temperatura fisiologica (37°C). Le sezioni ossee sono sottoposte a trattamenti sequenziali, in cui la composizione enzimatica viene adattata nel tempo per demolire complessivamente le componenti organiche indesiderate.

Il processo prevede inoltre lavaggi seriali in acqua ad alto grado di purezza in vasche ad ultrasuoni (sonicazione), con lo scopo di permettere la pulizia anche di sezioni ossee dello spessore di qualche centimetro così come sono richieste in ambiti diversi da quello odontoiatrico (ad esempio, in Ortopedia o Neurochirurgia).

Questa metodica di deantigenazione non richiede l'impiego di alcun solvente organico, eliminando gli svantaggi del metodo chimico o chimico-fisico (possibile permanenza di residui di solvente nel materiale finito o deantigenazione difettiva).

Inoltre, il fatto che il processo avvenga alla temperatura di 37°C assicura che il materiale non possa avere subito alterazioni dovute ad eccessivo calore.

Si ottengono in questo modo sostituti ossei il cui aspetto, in sezioni istologiche, è identico a quello dell'osso nativo, a meno dell'eliminazione di tutte le componenti cellulari.

A differenza di quanto accade per i materiali ottenuti per deantigenazione termica, l'adesività e la funzionalità di osteoclasti coltivati in vitro su questi materiali risultano inalterate rispetto quelle misurate sull'osso nativo, presumibilmente perché la superficie ossea non è alterata dal processo di deantigenazione ⁵⁷.

Il comportamento fisiologico osservato in vitro appare confermato in vivo dagli studi clinici in cui sono state eseguite anche analisi istomorfometriche, che mostrano che questo tipo di innesti sono soggetti a sostituzione completa con osso neo-formato del paziente, configurandosi quindi come veri e propri sostituti ossei rimodellabili ^{58, 59, 60}.

Per quanto riguarda la specie di provenienza del tessuto osseo da cui sono ricavati tali sostituti, si sceglie un materiale di origine equina sebbene a livello teorico essa non sia determinante ai fini della qualità degli innesti ottenuti con questa metodica. È certo, come si evince anche da misurazioni eseguite presso l'Istituto Superiore di Sanità, che dall'osso equino possono essere ricavate sezioni ossee che presentano una trabecolatura adeguata, per dimensioni, alla crescita dei vasi e alla proliferazione cellulare ⁶¹.

Allo stato attuale delle conoscenze medico-veterinarie, inoltre, non sono note malattie da prioni trasmissibili dal cavallo all'uomo, tanto che l'equino è escluso dall'attuale normativa comunitaria che classifica le specie a rischio (2003/32/CE per dispositivi medici fabbricati con tessuti di origine animale).

Gli equini da cui si ricava la materia prima (in genere si utilizza solo un particolare segmento osseo per motivi di omogeneità di processi di lavorazione, ad esempio il femore), sono animali la cui carne è destinata al consumo umano. Gli animali sono soggetti dunque a tutti i controlli veterinari prescritti dalle attuali normative. L'equino è inoltre un animale che viene allevato in recinto, con ampia possibilità di deambulare, e di conseguenza il suo apparato scheletrico è sottoposto a sollecitazioni meccaniche fisiologiche, a differenza di quanto accade per altre specie di animali domestici (suino, bovino) che sono allevati in spazi angusti con ridotte possibilità di movimento. Infine, gli equini la cui carne è destinata al consumo sono macellati giovani, e se ne ricava quindi un tessuto osseo dalle qualità meccaniche superiori.

3.2.6.4. Sostituti ossei ottenuti per deantigenazione enzimatica a collagene osseo preservato

La composizione della miscela enzimatica può essere adattata, entro i limiti della selettività degli enzimi adoperati, per preservare eventuali molecole organiche non antigeniche che conferiscono agli innesti particolari proprietà che non si vuole siano perdute a causa del processo di deantigenazione.

È questo il caso di una particolare classe di sostituti ossei di origine equina a componente collagenica preservata impiegati da anni in ambito Ortopedico e divenuti di largo impiego da qualche anno anche in ambito odontoiatrico ⁶².

L'ottenimento di questi innesti si basa sull'applicazione del processo di deantigenazione enzimatica in una sua forma selettiva, in grado di preservare il collagene osseo all'interno della matrice minerale nella sua forma non denaturata.

La presenza del collagene preservato nella sua conformazione nativa fa supporre innanzitutto che questi materiali, almeno in parte, siano in grado di mostrare alcuni degli effetti propri del collagene osseo, già descritti in precedenza.

Altrettanto importante appare il fatto che tali innesti, se in forma di blocchi ossei spongiosi o corticali, mantengono inalterate le proprietà meccaniche dell'osso da cui provengono: elasticità e resistenza alla trazione e alla compressione (motivo per cui sono da anni utilizzati in ambito Ortopedico).

Sono quindi, nella conformazione a blocchi o lamine, possibili sostituti degli innesti a blocco per la rigenerazione ad onlay sia del mascellare superiore che inferiore, pur richiedendo comunque l'impiego di membrane protettive a lunga permanenza. Il loro utilizzo si configura quindi in ogni caso come un intervento di rigenerazione ossea guidata da membrane (GBR).

Da un punto di vista di formato e conseguente metodica applicativa di questi sostituti possiamo distinguere:

- Blocchi d'osso spongioso: si tratta di sezioni d'osso spongioso a forma di parallelepipedo. Sono state utilizzate con successo per innesti onlay verticali, per la ricostruzione di mascellari inferiori e superiori atrofici, in abbinamento sia a membrane in e-PTFE che in pericardio. Le caratteristiche di resistenza meccanica di questi blocchi li rendono forabili e fissabili con

mezzi da osteosintesi senza il pericolo che si fratturino. Il loro rimodellamento richiede un tempo variabile da 8 a 12 mesi.

- Lamine spongiose flessibili: si tratta di lame d'osso spongioso a collagene preservato, da cui è stata allontanata una piccola frazione dei sali di calcio e fosforo per idrolisi acida. A causa della presenza del collagene osseo il materiale, invece di sfaldarsi, diviene flessibile. Questo permette il suo facile adattamento a superfici ossee curvilinee. Sono state impiegate con successo in interventi di innesto ad onlay laterale per incrementi orizzontali di creste mandibolari atrofiche ⁵⁸. Il loro rimodellamento si osserva in un tempo variabile dai 4 ai 6 mesi. Un impiego differente di queste lamine prevede il loro inserimento, negli interventi di rialzo di seno mascellare, a sollevamento della membrana di Schneider dopo il suo scollamento. La loro elasticità consente infatti l'inserimento, piegate, nella botola di accesso dove riaprendosi sollevano la membrana sinusale e la proteggono dalle successive operazioni di innesto ed eventuale posizionamento implantare.
- Lamine corticali flessibili: sono lamine d'osso corticale, anch'esse rese flessibili per demineralizzazione parziale, dello spessore di circa 2 mm, che possono essere utilizzate con successo per interventi di incremento verticale di cresta, laddove il loro utilizzo sia contestuale all'inserimento di impianti osteointegrati ⁶³.
- Il razionale d'impiego di questo tipo di lamina solo contestualmente all'inserimento degli impianti consiste nel lento rimodellamento di questo innesto (maggiore di 12 mesi): non essendo necessario definire una tempistica di rientro per il posizionamento implantare, già avvenuto, questo innesto garantisce massima stabilità e protezione alla componente granulare sottostante, andando infine incontro a rimodellamento non per colonizzazione dall'interno, ma per sostituzione progressiva dal lato a

contatto con lo stesso innesto granulare (creeping substitution). Un impiego alternativo di questo tipo di lamine (eventualmente anche in forma rigida) è l'innesto per creare un neopavimento del seno mascellare (mimando la tecnica di Tulasne), soprattutto se vi sono perforazioni estese della membrana di Schneider, ⁶⁴. La tecnica è applicabile anche in assenza di perforazioni della membrana, allo scopo di conferire maggiore protezione all'innesto sottostante dai movimenti della membrana sinusale causati dagli atti respiratori.

- Membrane corticali flessibili: si tratta di lamine simili alle precedenti, ma di spessore notevolmente minore (0.2 mm), che fungono da membrane riassorbibili a lunga permanenza. Trattandosi di osso corticale, infatti, il loro riassorbimento può avvenire solo per via osteoclastica. Una volta posizionate a protezione dell'innesto, la loro degradazione può avvenire solo ad opera degli osteoclasti che provengono dal sito innestato. Utilizzate con successo nella ricostruzione di ampie esposizioni implantari è stato dimostrato istologicamente che la loro occlusività è mantenuta a 6 mesi dall'innesto, permettendo di classificarle come reali membrane a lunga permanenza ⁶⁴.
- Innesti granulari: si tratta dei tradizionali granuli, sia d'osso spongioso che in miscele d'osso spongioso e corticale, disponibili anche in diverse granulometrie. Il tempo di rimodellamento varia dai 4-6 mesi della frazione spongiosa, agli 8-12 mesi della frazione corticale). La possibilità di impiegare granulometrie maggiori (3-4 mm) rende possibile eseguire in maniera più spedita i rialzi di seno mascellare ad accesso laterale, evitando l'eccessiva compattazione dei granuli e conferendo maggiore stabilità meccanica all'innesto stesso. Questi stessi innesti granulari sono disponibili anche in formulazioni estraibili in siringa (tramite miscelazione con gel inerti a base acquosa).

- Osteopromotori: sono granuli di collagene osseo ottenuti per demineralizzazione completa di osso corticale eterologo, e quindi classificabili come matrici ossee demineralizzate eterologhe (o DBM, Demineralized Bone Matrix). La deantigenazione enzimatica, selettiva, permette di preservare all'interno di questi materiali i fattori di crescita endogeni tipici dell'osso corticale. Questi, presenti in concentrazioni fisiologica, sono in grado di esercitare un certo potere di stimolazione. Pur non trattandosi di osteoinduzione forte (ovvero, in grado di generare tessuto osseo in siti eterotopici), il loro impiego, sempre congiunto ad altri materiali invece osteoconduttivi, si sta rivelando promettente, in particolare in quei siti di innesto dotati di potenziale rigenerativo ridotto, nell'incrementare la probabilità dell'intervento rigenerativo.

3.3. Guided bone regeneration (GBR)

La rigenerazione ossea guidata (GBR) come approccio chirurgico in implantologia, nei trattamenti di pazienti con atrofie ossee, è una tecnica predicibile e ben documentata. Essa si basa sull'utilizzo di membrane allo scopo di coprire difetti ossei e di ostacolare l'invasione dei tessuti molli circostanti.

In questo tipo di tecnica sono utilizzate principalmente due categorie di materiali: la barriera, per selezionare il tipo di cellule che andranno a colonizzare il sito trattato, ed il materiale riempitivo che sarà necessario per mantenere lo spazio sottostante, utile soprattutto con l'utilizzo di membrane riassorbibili.

Dall'anno 1982, anno dell'introduzione di questa tecnica, la barriera in PTFE-e ha rappresentato il gold-standard quale materiale per l'effetto barriera. Questo tipo di materiale non-riassorbibile ricalcava tutti i criteri necessari per la GBR

proposti da Hardwick, ovvero: biocompatibilità, adattabilità e mantenimento dello spazio con copertura del difetto, oltre alla stabilizzazione del coagulo.

La sua totale inerzia e biocompatibilità creano infatti l'ambiente e la protezione ideale per la maturazione dei tessuti neorigenerati.

Tuttavia le membrane PTFE-e presentano dei limiti quali: secondo intervento chirurgico per la loro rimozione; rischio di esposizione prematura con possibile contaminazione batterica e conseguente necessità di anticipata rimozione della stessa.

In considerazione di questi potenziali problemi sono state sviluppate e testate, sia sperimentalmente che clinicamente, nuove membrane riassorbibili.

Quindi, quando si parla di biomateriali in GBR risulta opportuno distinguere due categorie.

- Le membrane, che permettono la selezione delle cellule che andranno a colonizzare il sito;
- Il materiale riempitivo, che ha principalmente funzione di sostenimento della membrana stessa qualora essa non sia di per sé in grado di mantenere lo spazio, ma anche una funzione di impalcatura per guidare la crescita dei precursori degli osteoblasti dentro il difetto.

Al processo di rigenerazione ossea partecipano i tre meccanismi di base di formazione dell'osso:

- osteogenesi, cioè la capacità di creare centri di neoformazione ossea;
- osteoinduzione, ovvero il processo che stimola la neoformazione ossea a seguito della differenziazione delle cellule connettivali indifferenziate in cellule che producono osso;
- osteoconduzione, il processo biologico che fornisce una matrice di sostegno alle nuove cellule.

Da questo deduciamo che le tre condizioni di base che costituiscono i requisiti per la rigenerazione ossea sono:

- apporto di cellule che formano osso e di cellule che hanno la capacità di differenziarsi;
- presenza di stimoli osteoinduttivi, che danno il via alla differenziazione delle cellule mesenchimali in osteoblasti;
- presenza di un ambiente osteoconduttivo, ovvero una impalcatura su cui possano proliferare le cellule che invadono l'innesto.

In uno studio di Gottlow sulle scimmie alcune radici venivano coperte da membrane e dal lembo chirurgico ⁶⁵. Alla riapertura si notò che dove la membrana era collassata sulla radice si era sviluppato solo cemento con scarso osso, mentre laddove era stato creato uno spazio biologico tra membrana e radice si aveva una buona quantità di osso. Dunque se noi riusciamo a creare uno spazio isolato, grazie ad una membrana, lo stesso può essere invaso da cellule osteogenetiche provenienti dall'osso circostante, e quindi riusciremo ad avere una rigenerazione ossea più predicibile. Questo principio ha trovato riscontro in numerosi lavori sperimentali. Dahlin studiò la guarigione di difetti alveolari con o senza membrana nei ratti notando che, dopo 6 settimane, il lato trattato con membrana evidenziava una guarigione ossea quasi completa mentre nei lati trattati senza barriera permanevano i difetti, seppure di diametro ridotto. Risultati simili sono stati ottenuti da Kostopoulos e Karring utilizzando, in difetti del bordo inferiore del ramo mandibolare dei ratti, delle membrane riassorbibili.

Sempre Dahlin trattò con questa tecnica le deiscenze peri implantari e notò che la filettatura esposta era completamente coperta da osso neoformato dopo 6 settimane mentre nei siti senza membrana la porzione di impianto esposta era coperta da tessuto connettivo.

Warren, in un esperimento compiuto sulle scimmie, trattando siti post-estrattivi in cui erano posizionati immediatamente degli impianti, arrivò alla conclusione

che per ottenere una osteointegrazione predicibile la membrana, in questo caso non riassorbibile, non deve essere in comunicazione con la cavità orale durante il periodo di guarigione.

Seibert e Nyman provarono ad effettuare un aumento localizzato di cresta utilizzando la membrana non riassorbibile in politetrafluoroetilene espanso (PTFE-e) ⁶⁶. Si evidenziò come nei campioni in cui si era riuscito a creare uno spazio biologico sotto la membrana, dopo 55-90 giorni, l'osso aveva riempito completamente lo spazio, mentre i campioni di controllo senza barriera non mostravano alcuna formazione d'osso.

Tuttavia, studi recenti condotti da Roos-Jansaker mostrano la possibilità di trattare alterazioni perimplantari con o senza membrane di riassorbimento ⁶⁷.

3.4. Guided tissue regeneration (GTR)

Storicamente, la ricerca nel campo della rigenerazione parodontale si è concentrata sullo studio di un materiale da riempimento ideale per ricostruire i difetti ossei determinati dalla malattia parodontale. Ciò ha determinato lo sviluppo di tecniche che utilizzano innesti di osso autologo, allogenico, eterologo oppure composti sintetici. Poiché queste tecniche hanno avuto un successo limitato, la necessità di migliorare la rigenerazione dei tessuti parodontali ha condotto i ricercatori verso l'utilizzo dell'ingegneria tissutale. Essa rappresenta un campo recente della biologia ricostruttiva che utilizza mediatori meccanici, biologici e cellulari o biomateriali per facilitare la ricostruzione e la rigenerazione di un tessuto danneggiato. Ciò è possibile attraverso la manipolazione del processo di guarigione delle ferite, intervenendo su uno o più dei seguenti tre fattori chiave: le cellule, gli scaffold o matrici di sostegno e le molecole segnale.

Il concetto di ingegneria tissutale in parodontologia è iniziato con la guided tissue regeneration (GTR), un approccio meccanico che utilizza membrane non riassorbibili per rigenerare i difetti parodontali. La tecnica si basa sulla separazione delle cellule epiteliali e del tessuto connettivo gengivale dall'area in via di guarigione attraverso l'utilizzo di una barriera fisica che può consentire alle cellule del legamento parodontale di ripopolare le superfici radicolari precedentemente trattate. L'utilizzo per la prima volta della GTR su un dente umano è stato riportato da Nyman *et al.* (1982) ⁶⁶. Successivamente allo scollamento di lembi a tutto spessore, scaling delle superfici radicolari e rimozione di tutto il tessuto di granulazione è stato accertato un difetto parodontale di 11 mm. Prima di suturare i lembi, una membrana è stata posizionata per coprire le parti delle superfici radicolari trattate, il difetto osseo e la porzione di osso circostante. Le analisi istologiche eseguite dopo 3 mesi di guarigione hanno rivelato che nuovo cemento con l'inserzione di fibre collagene si era formato sulla superficie radicolare precedentemente esposta.

A partire dagli anni '90, la ricerca nell'ingegneria tissutale si è svolta in due grandi direzioni, sviluppando preparazioni contenenti mediatori biologici in grado di agire selettivamente sulle cellule che popolano i tessuti parodontali. Da un lato sono state utilizzate preparazioni semipurificate come i derivati della matrice dello smalto e le preparazioni di platelet-rich plasma (PRP) autologo; dall'altro lato invece sono stati studiati fattori di crescita ricombinanti, come il platelet-derived growth factor-BB (PDGF) umano ricombinante, e i morfogeni.

L'utilizzo del PRP come fonte di fattori di crescita nella rigenerazione ossea e parodontale è stato proposto da Marx (1998). Infatti, anticorpi monoclonali hanno identificato la presenza di platelet-derived growth factor (PDGF), insuline-like growth factor (IGFs) e transforming growth factor-beta (TGF- β) nei granuli citoplasmatici delle piastrine. Recentemente, analisi maggiormente

accurate sul PRP hanno evidenziato anche la presenza del basic fibroblast growth factor-2 (FGF-2), epidermal growth factor (EGF) e vascular endothelial growth factor (VEGF). L'insieme di questi fattori di crescita presenti nel PRP sono ritenuti in grado di stimolare la proliferazione dei fibroblasti e delle cellule del legamento parodontale, la formazione della matrice extracellulare e la neovascolarizzazione. Inoltre, il PRP potrebbe sopprimere il rilascio di citochine e limitare l'infiammazione, favorendo così la rigenerazione tissutale.

Il derivato della matrice dello smalto ricavato da denti di maiale in via di sviluppo è stato recentemente indicato come nuovo presidio per la capacità di indurre la rigenerazione parodontale. Il meccanismo d'azione è determinato dal contenuto di diverse proteine a basso peso molecolare che stimolano la crescita cellulare e il differenziamento delle cellule mesenchimali, inclusi gli osteoblasti. È stato dimostrato che il derivato della matrice dello smalto contiene il TGF- β e stimola l'espressione delle proteine morfogenetiche dell'osso e del TGF- β nelle cellule osteoblastiche. Esso, inoltre, favorisce l'angiogenesi stimolando la proliferazione e la chemiotassi delle cellule endoteliali. Quando applicato sulla radice, le proteine sono assorbite nelle fibre collagene e di idrossiapatite della superficie radicolare, dove inducono la formazione di cemento seguita dalla rigenerazione parodontale.

I fattori di crescita sono proteine che regolano vari aspetti della crescita cellulare e dello sviluppo. Recentemente, diversi fattori di crescita sono stati identificati e caratterizzati, alcuni dei quali sono presenti nella matrice ossea. Durante il processo di guarigione delle ferite, tali proteine modulano la proliferazione cellulare, la migrazione, la formazione della matrice extracellulare e altre funzioni cellulari. In aggiunta, alcuni fattori di crescita possono anche stimolare il differenziamento cellulare. Solo grazie all'avvento delle biotecnologie ricombinanti è stato possibile produrre adeguate quantità di fattori di crescita da usare nei modelli di studio animale e successivamente nei

trial clinici. Il PDGF è stato uno dei primi fattori ad essere stato studiato per il suo effetto nel processo di guarigione poiché è un potente fattore mitogeno e chemiotattico sulle cellule mesenchimali in coltura. L'efficacia di 0.3 mg/ml di PDGF umano ricombinante associato a fosfato tricalcico (GEM-21®) nel guadagno del livello d'attacco, del livello e del volume osseo è stato dimostrato in un trial clinico multicentrico. Una parte di questi pazienti sono stati controllati per 24 mesi ed è stato mostrato che un campione rappresentativo di casi era stabile con un aumento del livello osseo radiografico rispetto ai risultati ottenuti dopo 6 mesi.

Le proteine morfogenetiche dell'osso invece sono un gruppo di glicoproteine regolatrici che appartengono alla superfamiglia dei TGF- β . Queste molecole stimolano primariamente il differenziamento delle cellule staminali mesenchimali in condroblasti e osteoblasti. Poiché circa 10 kg di ossa bovine contengono solo 2 μ g di proteine morfogenetiche dell'osso solamente grazie all'utilizzo della tecnologia del DNA ricombinante è stato possibile produrne quantità adeguate per gli esperimenti. Recenti studi hanno utilizzato le proteine morfogenetiche dell'osso per determinare il loro potenziale nella correzione di difetti intraossei, sopra alveolari, della forcazione e fenestrazioni. Quando la proteina morfogenetica-2 dell'osso umana ricombinante è stata usata in difetti parodontali sopra alveolari, il guadagno di osso e di cemento è stato rispettivamente di 3.5 mm e 1.6 mm rispetto a 0.8 mm e 0.4 mm dei controlli.

3.4.1. G.T.R.

Questa procedura, definita rigenerazione guidata dei tessuti (GTR), prevede l'inserimento di una membrana, che funge da barriera, sotto il lembo di tessuto gengivale per:

- impedire la crescita verso l'interno di epitelio e del tessuto connettivo;

- permettere la creazione di uno spazio biologico sulla superficie radicolare da rigenerare per le cellule progenitrici del legamento parodontale, dei cementoblasti, dei fibroblasti e degli osteoblasti. Infatti, la loro migrazione permette di formare nuove strutture parodontali tra cui il cemento radicolare, il legamento parodontale e osso alveolare.

Come già visto ne paragrafo della GBR vi sono 2 tipi di membrane: riassorbibili e non riassorbibile. A parte il tempo di rimozione, che in questo caso è per le membrane non riassorbibile tra le 4 e le 6 settimane dopo l'intervento iniziale, le caratteristiche sono quelle descritte in precedenza.

Tutti i biomateriali riassorbibili (siano essi membrane o riempitivi) vengono giudicati in base a: biocompatibilità (risposta autoimmune – reazione tissutale); tempo di riassorbimento (caratteristiche istologiche); mantenimento dello spazio biologico per il tempo necessario (ed ovviamente differente a seconda che si tratti di rigenerazione parodontale od ossea). Studi su difetti ossei evidenziano, inoltre, l'importanza della porosità della membrana per aumentare l'integrazione e la vascolarizzazione tissutale a livello dell'impianto e la praticità clinica.

3.4.2. Biocompatibilità (risposta autoimmune, reazione tissutale)

Quando trattiamo materiali bioattivi nella pratica chirurgica dobbiamo assolutamente avere chiaro il concetto di biocompatibilità. Infatti risulta una condizione indispensabile, affinché un materiale possa essere innestato e/o impiantato, che esso sia biocompatibile.

Hench propose una definizione di biocompatibilità tuttora valida: un biomateriale è biocompatibile con il tessuto circostante se l'interfaccia tra tessuto vivente e materiale assomiglia il più possibile alle aree interfacciali naturali che vi si trovano ⁶⁸.

Inoltre i materiali devono avere caratteristiche osteoconduttive e/o osteoinduttive (materiali di riempimento) e non devono causare processi flogistici o immunitari.

3.4.3. Tempo di riassorbimento (caratteristiche istologiche)

Come è facile immaginare il tempo di riassorbimento è un parametro che risulta decisivo per il successo della terapia rigenerativa utilizzando i materiali riassorbibili. Infatti, per quanto riguarda le membrane queste devono rimanere in situ il tempo necessario affinché vi sia la maturazione del nuovo tessuto sottostante ad esse, mentre per i materiali riempitivi un loro mancato riassorbimento creerebbe delle zone ove non troveremmo nuovo osso, e questo potrebbe precludere o diminuire l'osteointegrazione degli impianti inseriti immediatamente o in un secondo tempo chirurgico.

È da tenere presente, quando si estrapolano i risultati sul tempo di riassorbimento dai diversi studi sperimentali, che i vari modelli animali incidono sicuramente sulla velocità di riassorbimento. Infatti la salute parodontale non è stata ancora classificata tra i modelli potenziali, in quanto i diversi metabolismi di questi animali non sono ancora perfettamente conosciuti.

3.4.4. Mantenimento dello spazio biologico

Le membrane riassorbibili attualmente in commercio si possono distinguere tra materiali che non hanno alcuna capacità di mantenere lo spazio (membrane in collagene), membrane che hanno una limitata capacità (alcune membrane adattabili sintetiche) ed altre che sono concepite per creare spazio (semirigide sintetiche). La natura delle barriere riassorbibili non prevede un'anima di rinforzo in titanio che permette, una volta modellata, di mantenere lo spazio biologico sottostante ad essa; pertanto, si rende necessario utilizzare un materiale di riempimento sotto la membrana stessa con la funzione di

sostenimento. Anche secondo Hockers le membrane riassorbibili aumentano la rigenerazione ossea soprattutto se supportate da materiale di riempimento ⁶⁹. Prenderemo a questo punto in considerazione, sia per le membrane che per i riempitivi, quelli che risultano essere al momento attuale le categorie principali a disposizione degli operatori, per valutarne i loro benefici in termini di miglioramento (clinico o di predicibilità del risultato) della prognosi per il paziente e nel contempo il loro costo in termini di eventuali rischi (cross-infection; reazioni allergiche; ecc).

Studi di Roos-Jansaker, Hugoson e Cortellini hanno dimostrato che sia per gli interventi di rigenerazione tissutale (GTR) che per quelli di rigenerazione ossea (GBR) le membrane riassorbibili sono altrettanto efficaci, se adeguatamente sostenute, della membrana in PTFE-e ^{67, 70, 71}.

Per migliorare il livello di successo, a questa tecnica tradizionale sono state affiancate strategie che utilizzano i fattori di crescita e le cellule staminali (vedi sezione ingegneria tissutale medesimo capitolo). Vi sono diversi lavori scientifici che dimostrano come vi siano buoni risultati di rigenerazione parodontale utilizzando fattori di crescita come proteine morfogenetiche ossee (BPM), fattore di crescita derivato dalle piastrine, amelogenine, e il fattore di crescita dei fibroblasti.

4. IMPORTANZA DEI TESSUTI MOLLI PER IL SUCCESSO IN IMPLANTOLOGIA

Il processo di osteointegrazione tra le diverse tipologie di impianti e l'osso è stato ampiamente studiato e descritto . La domanda che ci si deve porre è: per definire il successo di una terapia implantologica, è sufficiente il raggiungimento di un intimo contatto tra la superficie dell'impianto e la compagine ossea senza che vi sia interposizione di tessuto connettivo?

In realtà l'osteointegrazione della fixture risulta essere solo una delle componenti che partecipano al risultato finale, e dunque, anche al successo della terapia. Infatti, l'obiettivo è raggiungere una unità morfo-funzionale composta da impianto, tessuto osseo, tessuto connettivo e epitelio. Ottenere quindi oltre all'osteointegrazione dell'impianto anche la stabilità dei tessuti molli. A questo punto l'epitelio crea un sigillo che impedisce di fatto la penetrazione batterica. Come scrive Larjava H (2011) «L'adesione dell'epitelio alla matrice extra cellulare è cruciale per il mantenimento della salute sistemica e orale ⁷². Nella cavità orale i denti, o i denti artificiali sugli impianti, penetrano il tessuto molle della gengiva. In questa interfaccia il tessuto molle gengivale deve essere ben adeso per mezzo del sigillo epiteliale ai denti o alla superficie implantare per mantenerne la salute nel tempo. Dopo un insulto o una ferita l'epitelio migra rapidamente per formare l'iniziale copertura epiteliale, restaurando così la barriera contro le infezioni». Dunque, questo sigillo è sicuramente una delle chiavi del successo della nostra terapia implantologica, se riusciamo a preservarlo nel tempo esso potrà garantire il livello di salute del nostro impianto. È evidente come questo stato di integrità sia direttamente proporzionale alla quantità di potenziali patogeni parodontali presenti in tale sito. Risulta dunque fondamentale la collaborazione attiva del paziente che deve effettuare le manovre corrette di igiene orale domiciliare e presenziare alle

sedute di igiene professionale, per la fase di mantenimento, secondo indicazione del professionista.

Intorno ai denti naturali possiamo distinguere una ampiezza biologica, in condizioni fisiologiche, definita da epitelio sulcolare, epitelio giunzionale e connettivo. Mentre, in una situazione di salute di tutti i tessuti peri-implantari possiamo identificare uno spazio biologico che sarà definito come distanza tra il livello più coronale dell'osso crestale e il livello più coronale dell'epitelio. Secondo Bragger U (1997) l'altezza media dello spazio biologico è variabile da 3 a 3,7 mm e dipenderà dalle dimensioni verticali dell'epitelio, del solco epiteliale e del connettivo ⁷³.

Se in una prima valutazione superficiale si può pensare che queste due condizioni anatomiche, ampiezza e spazio biologico, possano essere la stessa cosa, la tabella qui sotto mostra come in realtà vi siano differenze fondamentali (**tabella 1**).

	DENTE NATURALE	IMPIANTO
FIBRE DELLO SHARPEY	vanno dal cemento radicolare all'osso	si dispongono circolarmente e parallelamente lungo l'asse dell'impianto
CELLULE DEL LEGAMENTO	fibroblasto-simili	non presenti
VASCOLARIZZAZIONE DELLA GENGIVA E CONNETTIVO SOPRACRESTALE	dai vasi sopraperiostali laterali dal processo alveolare dai vasi del legamento parodontale	dai vasi intraossei
CELLULE EPITELIALI	formano il sigillo sostenute dalle fibre parodontali	si uniscono al titanio con emo-desmosomi

Tabella 1

Queste differenze si traducono con risvolti clinici precisi. Noi sappiamo che la malattia parodontale ha una eziologia batterica, ma la sua progressione in profondità nei tessuti di sostegno del dente è principalmente legata ad una infiammazione prodotta da sostanze infiammatorie rilasciate dai batteri stessi. Grazie alla presenza del legamento parodontale la progressione della malattia è rallentata (a parte le forme rapidamente destruenti), e si manifesta con l'apicalizzazione del tessuto parodontale con conseguente aumento della tasca. Nella perimplantite non vi sono strutture parodontali profonde in grado di rallentare la progressione del processo. L'evoluzione della malattia è molto più rapida. La prevenzione della perimplantite risulta essere l'unica vera arma. L'identificazione immediata dell'insorgenza di una mucosite, ed il suo trattamento con terapia meccanica non chirurgica, è stato dimostrato essere un valido approccio per evitare l'insorgenza di perimplantite indotta da placca che purtroppo risulta essere molto frequente.

Il successo a lungo termine degli impianti è in buona parte legato all'apporto ematico dei tessuti perimplantari. A questo punto si rendono necessarie alcune precisazioni, per capire come salvaguardare il punto critico dagli attacchi dei patogeni parodontali, ovvero il complesso Impianto-Osso-Connettivo-Epitelio.

Il primo accorgimento è legato all'operatore. È infatti stato dimostrato come esistano una distanza minima tra due impianti e tra impianto e dente naturale (3mm), che vanno rispettate per garantire il giusto apporto ematico alle strutture anatomiche peri-implantari.

Il secondo riguarda il microgap tra abutment e impianto. Questo spazio può essere un punto di raccolta e proliferazione batterica. Weng sostiene che differenti configurazioni dei microgap influenzano la gravità e la forma dei difetti ossei perimplantari in impianti non sommersi posizionati a livello crestale e a livello subcrestale ⁷⁴. Per far fronte a queste problematiche, verso la fine degli anni novanta, è stata proposta una connessione di tipo conico la

quale, oltre a minimizzare e talvolta azzerare le dimensioni del microgap, sembra amplificare la distribuzione degli stress masticatori su un'area maggiore e, in definitiva, ridurre l'entità del riassorbimento osseo marginale.

La connessione conica è spesso associata ad un altro concetto, quello di "platform switching", che implica la riduzione del diametro dell'abutment rispetto alla piattaforma implantare al fine di allontanare il gap della connessione implanto-protetica dal tessuto osseo peri-implantare preservandone il riassorbimento.

In uno studio pubblicato da Tarnow, nel quale viene valutato il riassorbimento osseo interimplantare fra impianti privi di platform switching sostiene, sulla base dei risultati ottenuti in termini di riassorbimento, la necessità di posizionare impianti a distanze superiori a 3 mm l'uno dall'altro ⁷⁵. Dai suoi dati emerge, infatti, come la perdita ossea crestale in sede interimplantare sia mediamente di 1.04 mm. In un altro lavoro dello stesso Tarnow, è stato valutato nuovamente il riassorbimento interimplantare fra impianti posizionati a distanze minori di 3 mm ma, in questo caso, gli impianti erano dotati di platform switching. I dati raccolti evidenziano valori di riassorbimento medio di 0.62 mm.

È ormai pensiero comune che gli impianti a connessione conica e con platform switching siano un valido strumento da utilizzare per minimizzare i fisiologici livelli di perdita ossea successivi all'inserimento della fixture implantare e per rendere, quindi, la presenza dei tessuti molli più stabile nel tempo.

In conclusione, la preservazione della salute dell'unità impianto-tessuti molli-osso è dunque affidata alla capacità di mantenere l'area libera da placca e da patogeni. Impegno questo che, in parte, è legato ad aspetti meccanici della componentistica e per altra parte all'impegno costante nel mantenimento di una valida igiene orale domiciliare e professionale.

5. RIGENERAZIONE E GESTIONE DEI TESSUTI MOLLI

L'implantologia degli anni '90 è stata caratterizzata da un protocollo chirurgico estremamente rigido per cercare di rendere il più possibile predicibile e ripetibile la terapia implantare. Oggi molte parti di questo protocollo sono state modificate e alcuni concetti appaiono quasi in antitesi con quanto sostenuto negli ultimi 15 anni. Molteplici fattori concorrono all'ottenimento e al mantenimento a lungo termine dell'osteointegrazione, tra cui, come abbiamo visto nel capitolo precedente, l'ampiezza e l'integrità dei tessuti molli perimplantari. Infatti, molti autori hanno compreso l'importanza di poter disporre per i nostri restauri implantoprotesici (come per i denti naturali con parodonto integro) di un sigillo biologico ben rappresentato, oltre ad una bassa carica batterica perimplantare simile a quella che si rileva su un parodonto sano.

Quando esponiamo un impianto ed inseriamo un elemento transmucoso l'organismo si sforza di realizzare una barriera meccanica alla penetrazione batterica e la mucosa che circonda l'impianto si ricopre di tessuto cheratinizzato supportato da un connettivo sopracrestale denso di fibre collagene, che decorrono parallele alla superficie implantare mimando la struttura del parodonto.

Come visto, tale struttura viene definita ampiezza biologica. Dal momento in cui questo concetto è stato accettato e supportato da studi clinici sono state introdotte alcune tecniche chirurgiche volte ad assicurare la presenza di una banda di gengiva aderente attorno agli impianti, o ad aumentarne lo spessore per ottimizzare la protesizzazione nelle zone estetiche. Ne sono esempi, come vedremo, la traslazione di gengiva o la tecnica roll-flap. Queste tecniche vengono eseguite normalmente in fase di riapertura degli impianti. La carenza quali-quantitativa dei tessuti molli perimplantari è in genere legata ad un

deficit osseo nello stesso sito, per cui potrà essere affrontata già al momento del posizionamento implantare o ancora prima con interventi ricostruttivi-rigenerativi volti al ripristino di una normale morfologia ossea. Spesso però accade che la perdita ossea ed il successivo collasso dei tessuti molli avvengano durante la fase di guarigione che segue il posizionamento implantare, manifestando gli esiti proprio al momento della seconda fase chirurgica. In situazioni del genere ed in tutte quelle altre in cui si decida già al momento del posizionamento implantare di utilizzare solo l'osso residuo senza ricorrere a tecniche rigenerative, la seconda fase chirurgica rappresenta un importante momento in cui una adeguata gestione dei tessuti molli può mascherare il deficit osseo sottostante. Nel corso degli anni sono stati proposti diversi tipi di approccio chirurgico al momento dell'esposizione implantare; uno degli approcci più utilizzati è quello che prevede l'esecuzione di incisioni semilunari a convessità palatale o linguale. Tale semplice incisione consente di trasportare una quota di gengiva aderente dal versante crestale ed orale a quello vestibolare, migliorando l'estetica a questo livello; dopo una iniziale fase in cui viene a crearsi una architettura gengivale inversa, il successivo rimodellamento tissutale porterà al ripristino della normale architettura gengivale.

Nelle situazioni cliniche caratterizzate da una particolare valenza estetica, come nei settori frontali, qualora si osservi una scarsità dei tessuti molli peri-implantari e dunque si prevedano problematiche di tipo estetico, è possibile, al momento dell'esposizione implantare, effettuare un piccolo intervento, denominato Roll Flap, che in genere porta ad un deciso miglioramento dell'estetica gengivale degli elementi implanto-protesici. Un'altra tecnica di recente invenzione è quella proposta da Tinti e Parma Benfenati (2012) chiamata trap door technique (tecnica a botola) ⁷⁶. Questa nuova tecnica è notevolmente indicata per una chirurgia implantologica monofase sia in casi di mono- che pluri-edentulia, e permette di preservare l'integrità delle papille ed eliminare

concavità dei tessuti molli a livello buccale. Inoltre, tale procedura permette di risolvere anche il problema della presenza di un triangolo nero a livello interprossimale, permettendo lo sviluppo papillare.

È ovvio come prima di decidere qualsiasi delle tecniche sopracitate, soprattutto in zone altamente estetiche, sia indispensabile valutare alcuni parametri.

1. Linea del labbro o del sorriso: di solito, in un sorriso nella media, vengono visualizzati 75-100% degli incisivi superiori e la porzione di gengiva interprossimale. Si possono distinguere tre tipologie di linea del sorriso:

- Bassa: il risultato estetico è legato principalmente alla visualizzazione della metà incisale dei denti anteriori del mascellare. Con la linea del labbro o del sorriso bassa, il rischio estetico è limitato.
- Media: in questo caso il rischio è maggiore, si intravedono le papille e il risultato è vincolato ai fattori che caratterizzano l'impatto visivo del dente: restauri dei denti adiacenti, colore, forma, struttura, proprietà ottiche ecc.
- Alta: il paziente mostra, oltre ai denti, anche il tessuto di sostegno. Rappresenta un elevato rischio estetico, perché risultano di importanza fondamentale i profili dei tessuti molli perimplantari e la loro stabilità nel tempo.

2. Posizione del dente estratto: la posizione del dente da estrarre deve essere valutata nei tre piani dello spazio: apico-coronale, buco-linguale e mesiodistale. Ad esempio se vi è un dente posizionato molto vestibolarmente, questo può spesso tradursi con una compagine ossea buccale molto sottile o inesistente, al contrario, un dente posizionato più lingualmente potrebbe farvi avvalere della presenza di una maggiore quantità di ossa buccalmente.

3. Posizione radice dei denti adiacenti: se le radici dei denti adiacenti sono molto vicine alla radice del dente da estrarre, è possibile che dopo l'avulsione l'osso interprossimale possa essere molto sottile o a tratti assente, con conseguente aumento del rischio di riassorbimento laterale e conseguente diminuzione dell'altezza verticale dell'osso.
4. Biotipo del parodonto e la forma del dente: due diversi biotipi parodontali sono stati descritti in relazione alla morfologia della papilla interdentale e dell'architettura ossea: 1. il parodonto sottile e smerlato; 2. il parodonto spesso e piatto. È ovvio come per il clinico avere a che fare con un biotipo di tessuto molle spesso è sicuramente più desiderabile, in quanto questo influenzerà positivamente il risultato estetico di un impianto. Infatti, essendo più resistente agli insulti meccanici e chirurgici, e di conseguenza meno suscettibile alle recessioni mucose, darà maggior stabilità nel tempo al risultato estetico raggiunto. Infine, l'impianto avrà più volume a disposizione per lo sviluppo del manufatto protesico. La morfologia del dente sembra essere fortemente correlata alla qualità dei tessuti molli. Solitamente, la forma triangolare del dente è associata al fenotipo di parodonto sottile. Il punto di contatto si trova nel terzo coronale della corona, di conseguenza si formerà una papilla lunga e sottile. Quando troviamo una forma coronale quadrata, questa solitamente si accompagna con un fenotipo parodontale spesso. Il punto di contatto si trova sul terzo mediano troveremo una papilla corta e larga. È evidente come la perdita di tessuto interprossimale in presenza di una forma del dente triangolare esiterà in un triangolo nero più ampio rispetto a una situazione in cui la forma del dente risulta essere quadrata.

5. L'anatomia ossea del sito implantare: per un'efficace restauro protesico a elevata valenza estetica, importante è la valutazione tridimensionale dell'osso che consente il posizionamento ideale dell'impianto. Due sono le strutture anatomiche importanti nel determinare la prevedibilità dei tessuti molli dopo l'inserimento dell'impianto; il primo è rappresentato dall'altezza e lo spessore della parete ossea buccale, il secondo dall'altezza della cresta dell'osso alveolare a livello interdentale.
6. Altezza e spessore della parete ossea buccale: in uno studio di Kois è stato dimostrato che maggiore è la distanza dalla cresta ossea al margine gengivale libero, maggiore è il rischio di perdita di tessuto dopo una procedura invasiva ⁷⁷.
7. Altezza della cresta ossea nella zona interprossimale: la cresta ossea interprossimale gioca un ruolo critico per la presenza o assenza delle papille perimplantari. Infatti, quando avremo una distanza tra il punto di contatto e l'osso di 3-5 mm, la papilla riempirà sempre lo spazio; quando la distanza è di 6 mm avremo una perdita della papilla del 45% nel tempo; infine, se la distanza raggiunge i 7 mm, avremo una perdita della papilla del 75% nel tempo. Come possiamo notare una differenza di soli 1-2 mm risulta essere significativa nell'ottenere una ottima estetica dei tessuti molli.

6. LE MEMBRANE IN COLLAGENE

Le membrane hanno un ampissimo impiego nei diversi campi dell'odontoiatria. Agiscono da barriera selettiva in grado di preservare gli spazi sottostanti da eventuali infiltrazioni batteriche e cellulari, e possono garantire al contempo una funzione di *scaffold* per la rigenerazione dei tessuti.

Come visto, le caratteristiche basilari che le membrane devono possedere sono state schematizzate da Hardwick *et al.* nel 1994 e comprendono ⁷⁸:

- Biocompatibilità: devono essere costituite da materiali che non inneschino, reazioni di tipo citotossico e/o immunogenico;
- Occlusività: devono impedire il passaggio di tessuto connettivo ed eventuali contaminazioni batteriche al di sotto di essa, permettendo al contempo lo scambio di nutrienti mediante apporto ematico;
- Integrazione nei tessuti ospiti;
- Mantenimento dello spazio sottostante: devono consentire la stabilizzazione del coagulo e la conseguente rigenerazione tissutale;
- Maneggevolezza: devono poter essere facilmente adattate alle diverse condizioni anatomiche riscontrate dal chirurgo.

Possono essere divise in due categorie principali: riassorbibili e non riassorbibili. Queste ultime, tra cui le più comuni sono quelle a base di politetrafluoroetilene espanso (ePTFE), sono caratterizzate dalla necessità di venire rimosse chirurgicamente mediante un secondo intervento, con conseguente incremento della morbidità per il paziente e rischio di danni accidentali ai tessuti circostanti. Confrontate con le membrane riassorbibili, le membrane a base di ePTFE hanno inoltre dimostrato una maggiore tendenza all'esposizione e conseguente infezione ^{79, 80}. Studi svolti da diversi gruppi hanno evidenziato un incremento nella guarigione dei tessuti molli nel caso

dell'utilizzo di membrane riassorbibili, integrate in maniera completa nei tessuti e attive come supporto per la rigenerazione tissutale ^{81, 82, 83, 84}. In parallelo è stata riscontrata una riduzione del rischio di contaminazione batterica in virtù della rapidità di degradazione qualora esposte ⁸⁴. Tra gli svantaggi nell'utilizzo delle membrane riassorbibili vanno comunque indicati la non completa predicibilità del tempo di riassorbimento, legata alla tipologia di materiale utilizzato e alle caratteristiche del singolo individuo, e la tendenza al collasso che queste membrane hanno talvolta dimostrato in assenza di un adeguato supporto.

Tra le membrane riassorbibili quelle maggiormente diffuse e studiate sono quelle a base di collagene. Con questo termine si identifica una famiglia proteica a cui afferiscono diversi membri indicati come "tipi". Tra questi il più comune ed utilizzato è il collagene di tipo I, componente predominante del tessuto connettivo, utilizzato da solo, in combinazione con collagene di tipo III o ad altre sostanze chimiche nella composizione delle membrane attualmente presenti sul mercato. Queste possono derivare da collagene estratto da tendini o derma di origine suina, bovina o equina, o essere delle vere e proprie membrane biologiche quali il pericardio bovino o equino, utilizzate come membrane chirurgiche.

Il collagene è caratterizzato da una completa biocompatibilità, biodegradabilità e da una bassa immunogenicità, e sono facilmente riassorbibili mediante digestione enzimatica ^{85, 86, 87}. Il collagene possiede inoltre attività emostatica e chemiotassica nei confronti dei fibroblasti del legamento periodontale e della gengiva, favorisce l'incremento di spessore tissutale ed è di facile manipolazione ^{88, 89, 83, 90}. Il riassorbimento delle membrane in collagene è dovuto principalmente all'attività delle collagenasi, e può variare, a seconda delle membrane, dalle 4 alle 24 settimane. A tutt'oggi le membrane in collagene

vengono ampiamente utilizzate con ottimi risultati in interventi di rigenerazione tissutale e ossea guidata (GTR e GBR).

Vista la varietà di applicazioni chirurgiche in cui vengono utilizzate, la possibilità di ottenere membrane in collagene caratterizzate da tempi di riassorbimento e di protezione più lunghi è stata oggetto di numerosi studi. Sono oggi presenti sul mercato membrane in grado di garantire questo risultato grazie alla presenza di legami incrociati (*cross-link*) tra le molecole di collagene che le compongono. Questi legami vengono creati mediante l'utilizzo di specifiche sostanze chimiche o tramite irraggiamento. L'utilizzo di questo tipo di membrane risulta però limitato dai rischi legati alla possibile presenza di residui di lavorazione potenzialmente citotossici e dall'effetto negativo di un elevato numero di *cross-link* sulla colonizzazione delle membrane da parte dei fibroblasti e sulla vascolarizzazione delle stesse, con il conseguente incremento nel rischio di esposizione ^{91, 90}. Ulteriori tentativi di prolungare il tempo di degradazione delle membrane sono stati effettuati ricorrendo all'utilizzo di membrane in doppio strato o immergendo preventivamente le membrane in soluzioni a bassa concentrazione di tetraciclina, antibiotico in grado di inibire l'attività delle collagenesi ^{92, 93, 94, 95}. Considerato comunque il costo elevato delle singole membrane e la necessità di utilizzare soluzioni antibiotiche solo se strettamente necessarie, onde evitare l'insorgenza di ceppi microbici resistenti, l'adozione di queste pratiche è sconsigliata, prediligendo invece la scelta accurata della membrana collagenica caratterizzata da tempi di riassorbimento e/o di protezione più adatti alle singole esigenze chirurgiche. Per piccoli interventi di GBR o di GTR l'utilizzo di membrane a basso tempo di riassorbimento può essere sufficiente all'ottenimento di un risultato ottimale, mentre per siti più ampi o impegnativi, le membrane in pericardio o in altri

tessuti biologici, garantiscono tempi di protezione e riassorbimento più adeguati ^{96, 97, 98, 99}.

Il biomateriale che verrà utilizzato per la tecnica che vedremo esposta nel successivo capitolo è un feltro in collagene, prodotto dalla Bioteck, per la precisione parliamo di collagene di tipo I derivante da tendine di Achille equino; che può essere considerata una membrana grezza, non ancora sottoposta a pressione. Teniamo presente che il cavallo è il più sicuro tra gli animali per la produzione di biomateriali, perché:

- non sono note malattie da prioni equine trasmissibili all'uomo.
- questo animale viene allevato in recinto e questo gli consente di mantenere un corretto trofismo osseo. I sostituti ossei di origine equina hanno quindi ottime caratteristiche meccaniche.
- sono trattati con un esclusivo processo di deantigenazione per via enzimatica effettuato a 37°C, che rimuove tutte le componenti immunogeniche senza alterare le proprietà biologiche e biomeccaniche dell'osso. Questi sostituti ossei sono la matrice biologica pura dell'osso. La presenza di collagene nativo inoltre li rende un perfetto scaffold per la rigenerazione.

Questo tipo di presidio è ampiamente utilizzato in ortopedia ma ancora scarsamente utilizzato in odontoiatria.

7. STUDIO SPERIMENTALE

7.1 Introduzione

La perdita di tessuto osseo a livello orale può essere causata da molteplici fattori. Spesso, a causa di atrofia o traumi, non è possibile effettuare una riabilitazione protesica su impianti osteointegrati. Il processo che porta alla chiusura dell'alveolo a seguito di un'estrazione dentaria, è stato oggetto di svariati studi.

Si è dimostrato come questo processo comporti una serie di fasi, tra cui la formazione e la maturazione del coagulo, l'infiltrazione del coagulo da parte dei fibroblasti e la stabilizzazione della matrice extracellulare ¹⁰⁰.

A livello mucoso abbiamo due tipologie di guarigione:

per prima intenzione, nella quale la perdita di tessuto è trascurabile, i margini sono netti e si giustappongono in modo naturale;

per seconda intenzione, nella quale la perdita di tessuto è maggiore ed è necessaria la creazione di nuovo tessuto connettivo per permettere la chiusura della ferita.

Come ben noto dalla letteratura, durante le fasi di guarigione, l'osso va incontro a cambiamenti dimensionali che possono complicare il successivo inserimento dell'impianto.

Ciò accade in particolare nei casi in cui l'impianto debba essere inserito a distanza di mesi dall'estrazione.

Questo può accadere per diversi motivi come ad esempio:

siti implantari con limitata altezza ossea (importanti difetti apicali), in pazienti giovani ancora in fase di crescita, oppure in pazienti dove le condizioni di salute generale sconsigliano l'inserimento implantare.

In questi casi è possibile intervenire chirurgicamente con l'obiettivo di ottenere una rigenerazione del tessuto osseo andato perso ¹⁰¹.

Come sappiamo i processi alveolari dei mascellari sono strutture che subiscono notevoli modificazioni strutturali nell'arco della vita. Queste modificazioni sono particolarmente accentuate in assenza degli elementi dentari ¹⁰².

La dinamica e l'intensità di questi cambiamenti sono stati studiati in numerose ricerche su animali ^{103, 104, 105} oltre che sugli esseri umani ^{106, 107, 108, 109}

Sono stati effettuati diversi studi clinici con l'obiettivo di valutare queste variazioni dimensionali attraverso analisi volumetriche ed è risultato che, nei primi 12 mesi, la perdita di volume in senso orizzontale è di 5-7 mm, circa 50% dello spessore iniziale. ^{102, 110, 111, 112}

Il riassorbimento osseo è più pronunciato sul versante vestibolare mentre nei settori posteriori è delimitato al terzo marginale.

Si è ipotizzato che questo riassorbimento più pronunciato a livello vestibolare sia dovuto al fatto che vi è maggior presenza di osso spugnoso o di derivati dentinali ¹⁰⁴.

Una volta che la parete buccale dell'elemento estratto si è riassorbita parzialmente o completamente, si ha anche un collasso dei tessuti molli. ¹¹

In particolare, nei settori anteriori, queste modificazioni possono mettere a repentaglio il risultato estetico di ogni trattamento che includa estrazioni.

Sono state introdotte diverse modalità di trattamento per ridurre le modificazioni volumetriche. Dal momento che l'inserimento implantare non è in grado di modificare i processi biologici, è stato proposto l'utilizzo di diversi tipi di bio-materiali all'interno degli alveoli post-estrattivi con l'intento di mantenere il volume osseo crestale.

La funzione degli innesti ossei è quella di migliorare la stabilità del coagulo e di ridurre il rischio di collasso dei tessuti molli all'interno del difetto osseo.

Come sappiamo il razionale biologico nell'utilizzo degli innesti ossei è basato su tre meccanismi di guarigione diversi:

- Osteogenesi
- Osteoinduzione
- Osteoconduzione

I materiali da innesto possono quindi essere suddivisi in quattro categorie diverse:

- Innesti autologhi: rappresenta sicuramente il miglior materiale da innesto, poiché racchiude in sé tutte e tre le proprietà sopra elencate. Sappiamo anche che il prelievo di osso autologo è una procedura invasiva che spesso richiede un secondo accesso chirurgico nella zona donatrice.
- Innesti allogenici: si tratta di innesti trasferiti da soggetti della stessa specie ma geneticamente diversi; si utilizzano osso spugnoso e midollo osseo congelati oppure osso liofilizzato e congelato.
- Innesti xenogenici: si tratta di innesti provenienti da donatori appartenenti a una specie diversa;
- Materiali alloplastici: si tratta di materiali riempitivi sintetici o inorganici impiegati in sostituzione degli innesti ossei.

I sostituti ossei rappresentano quindi una possibile alternativa all'osso autologo valida in molti casi. Idealmente un sostituto osseo dovrebbe avere determinate caratteristiche:

- biocompatibilità
- proprietà antigeniche

- mantenimento dello spazio
- facilità di utilizzo

Questi tipi di bio-materiali hanno essenzialmente proprietà osteoconduttive poiché garantiscono un supporto biomeccanico che dà stabilità al coagulo durante le prime fasi di guarigione, e funge da scaffold per la formazione di nuovo osso nelle fasi successive ¹¹³.

Molti studi hanno proposto diverse tecniche di preservazione della cresta ossea post-estrattiva attraverso l'utilizzo di biomateriali e/o membrane dimostrando una riduzione significativa del riassorbimento osseo. Tuttavia i dati raccolti da studi sperimentali hanno dimostrato che l'utilizzo di bio-materiali all'interno degli alveoli post estrattivi non è in grado di diminuire il riassorbimento osseo sul versante buccale ^{114, 115}.

Sono state inoltre sviluppate diverse tecniche per permettere una guarigione per prima intenzione dei siti post-estrattivi da parte dei tessuti molli, principalmente in relazione all'immediato inserimento di impianti.

Sappiamo che la rigenerazione può essere definita come la possibilità di ricostituzione dei tessuti lesi con cellule dello stesso tipo di quelle danneggiate. Le rigenerazioni dei tessuti che conosciamo sono la Guided Bone Regeneration (GBR) e la Guided Tissue Regeneration (GTR). Esse possono essere considerate i precursori dell'ingegneria tissutale. Le considerazioni da fare su queste tecniche partono dal concetto che esse non si occupano principalmente del tessuto molle. Nel caso della Guided Bone Regeneration l'obiettivo è la rigenerazione ossea; in questo caso il nostro paziente necessita di un secondo intervento di gestione dei tessuti molli. Nel caso della Guided Tissue Regeneration, invece, si ha la rigenerazione dell'intero comparto parodontale (cemento radicolare, legamento parodontale, osso e connettivo). Inoltre, dobbiamo tenere presente che la

matrice, che sia essa riassorbibile o non, deve assolutamente mantenersi coperta dalla gengiva. Se ciò non avviene vi è il rischio di insuccesso della terapia.

Ad oggi comunque non si è ancora raggiunta una conclusione su quale tecnica di preservazione della cresta ossea sia più predicibile.

Dalla letteratura si evince dunque che nella maggior parte dei casi è necessario innestare del materiale biocompatibile, che funga da impalcatura (scaffold) a vasi e cellule.

Inserire quindi un biomateriale che impedisca il collasso delle corticali ossee.

Il problema della ridge preservation (socket preservation) è che manca tessuto molle per poter ottenere una guarigione per prima intenzione dei tessuti molli che è uno dei principi cardine per il successo clinico della rigenerazione con biomateriali ¹¹⁶.

Ci siamo quindi chiesti se è davvero impossibile poter ottenere un buon attecchimento del biomateriale innestato senza avere una guarigione mucosa per prima intenzione.

Il lavoro degli autori prevede scoprire istologicamente:

- se è possibile ottenere, con una guarigione per seconda intenzione, un buon attecchimento dei biomateriali innestati.
- se è possibile ottenere una rigenerazione dei tessuti molli sovrastanti.

Da qui nasce l'idea di utilizzare oltre al sostitutivo osseo anche un sostitutivo gengivale composto da due strati esattamente come la gengiva; uno che riproduca la lamina propria connettivale e un o più superficiale che emuli lo strato epiteliale.

7.2 Materiali e metodi

È stato selezionato un paziente che necessitava dell'estrazione di due elementi dentari che fossero molari o premolari inferiori.

Il paziente doveva necessariamente essere maschio o femmine di età compresa tra i 25 e i 70 anni, di qualsiasi razza, in buone condizioni di salute, capace di capire le procedure dello studio e di confrontarsi con esse per tutta la durata dello stesso. Inoltre doveva essere in capacità e volontà di firmare il consenso informato per iscritto che prevede l'inserimento implantare contestualmente al prelievo di tessuto per l'analisi istologica. I pazienti che non rispondevano a questi criteri di inclusione non potevano partecipare allo studio.

Il soggetto arruolato era libero di abbandonare spontaneamente lo studio in qualunque momento. Inoltre era prevista l'esclusione del paziente dallo studio in caso di:

- mancata adesione al programma terapeutico
- inosservanza delle prescrizioni che il protocollo richiedeva, come per esempio la mancata presenza alle visite programmate
- l'inosservanza dell'igiene domiciliare prescritta.

Lo studio consisteva nel confronto di due valutazioni istologiche.

I siti estrattivi del paziente selezionato sono stati suddivisi in due gruppi:

- Gruppo A (estrazione A) - TEST: l'elemento dentario di questo gruppo è stato sottoposto ad estrazione con successiva preservazione della cresta tramite innesto di biomateriale eterologo e due feltri in collagene.
- Gruppo B (estrazione B) - CONTROLLO: l'elemento dentario di questo gruppo è stato sottoposto a una semplice estrazione dentale senza l'innesto di alcun biomateriale.

Dopo la firma del consenso al trattamento, il paziente è stato sottoposto a esami radiografici (endorali e ortopantomografia) ed almeno una seduta di igiene orale prima delle procedure chirurgiche (T0). **Figura 1**

Nella seconda fase, il paziente è stato sottoposto a due estrazioni dentarie: mentre per un sito si prevedeva una guarigione spontanea (T28), per l'altro si

prevedeva un intervento di preservazione di cresta al tempo T1; a tre mesi da ogni estrazione (T90A e T90B), sono stati effettuati i rientri chirurgici in entrambi i siti. Sono stati prelevati i campioni biotici e contestualmente posizionati gli impianti con tecnica trans-mucosa sia nel gruppo test che nel gruppo controllo.

La tecnica di preservazione prevedeva un estrazione atraumatica, eventualmente separando le radici, esattamente come nel caso dell'estrazione del sito controllo.

Si è quindi proceduto ad un delicato scollamento dei tessuti molli intorno ai margini dell'alveolo, senza traumatizzare o lacerare le papille interdentali. Successivamente l'alveolo è stato riempito con biomateriale eterologo (OX31) (Bioteck s.p.a. Arcugnano, Vicenza - Italy).

A questo punto è stato posizionato un primo sigillo di Xenomatrix (Bioteck s.p.a. Arcugnano, Vicenza - Italy) e successivamente un secondo strato di Xenomatrix (Bioteck s.p.a.), il tutto stabilizzato con una sutura in seta 3-0 (Ethicon s.p.a. Pomezia, Roma - Italy).

I due strati di matrice sono stati preparati per il sito con due forme diverse. Il primo strato, quello più profondo, aveva una forma ovale e aveva la funzione di barriera, il secondo invece, aveva un corpo ovale e due alette, che hanno la funzione di infilarsi tra periostio scollato ed osso, per garantire una migliore stabilità.

Il biomateriale utilizzato per la tecnica, Xenomatrix (Bioteck s.p.a.), è una matrice in collagene. Si tratta di collagene di tipo I derivante da tendine d'Achille equino; può essere considerata una membrana grezza, non ancora sottoposta a pressione.

Come innesto granulare è stata scelta una miscela di osso spongioso e corticale di origine equina di granulometria 0,5 – 1 mm.

Tra gli animali, il cavallo è il più sicuro tra gli animali per la produzione di biomateriali. Infatti, non sono note malattie da prioni equini trasmissibili all'uomo. Inoltre questo animale viene allevato in recinto e ciò gli consente di mantenere un corretto trofismo osseo. I sostituti ossei di origine equina hanno quindi ottime caratteristiche meccaniche. Infine, essi sono trattati con un esclusivo processo di deantigenazione per via enzimatica effettuato a 37 °C, che rimuove tutte le componenti immunogeniche senza alterare le proprietà biologiche e biomeccaniche dell'osso. Questi sostituti ossei sono la matrice biologica pura dell'osso. La presenza di collagene nativo, inoltre, li rende un perfetto scaffold per la rigenerazione.

L'impianto utilizzato è un Way Milano 5,5 mm per 10 mm di altezza con superficie Syntegra (Geass srl, Pozzuolo del Friuli (UD) - Italia).

Fase pre-chirurgica

Tutti i pazienti dovevano seguire un determinato tipo di preparazione pre-chirurgica che prevedeva:

Terapia antibiotica

- 2 gr di amoxicillina, o 600 mg di clindamicina in caso di allergie alle penicilline, per via orale 1 ora prima dell'estrazione
- 2 gr di amoxicillina, o 300 mg di clindamicina per via orale due volte al giorno per 4 giorni

Sciacquo

- 1 minuto con clorexidina allo 0,20% prima della chirurgia
- Anestesia

- anestesia locale (lidocaina con adrenalina 1:50.000)

Fase chirurgica:

La fase chirurgica prevedeva l'utilizzo di un unico operatore.

L'estrazione doveva avvenire in modo non traumatico con eventuale separando le radici; una volta eseguita l'estrazione si è proceduto ad un delicato curettage dell'alveolo con successiva irrigazione dello stesso con soluzione fisiologica sterile.

Nel sito che prevedeva la preservazione di cresta sono stati inseriti il mix di osso corticale e spongioso di origine equina (OX31 Biotech s.p.a.) ed un doppio strato di Xenomatrix (Biotech s.p.a.)

I tessuti molli:

- Sono stati scollati solo leggermente al fine di posizionare meglio la membrana.
- non è stata effettuata alcuna incisione di rilascio
- la membrana in collagene è stata lasciata intenzionalmente esposta e stabilizzata con punti di sutura
- il punto di sutura è stato usato anche nel caso dell'estrazione B che non prevedeva l'utilizzo di biomateriali. **Figure 2 - 3 - 4a - 4b - 5 - 6 - 7 - 8 - 9 - 10a - 10b**

La fase post-chirurgica prevedeva:

Anti-infiammatorio: naprossene sodico 500 mg per via orale in compresse al bisogno

Sciacquo con collutorio: 1 minuto con clorexidina allo 0,20% due volte al giorno per 3 settimane

Il paziente è stato richiamato ad una settimana da ogni estrazione per la rimozione dei punti e la raccolta di immagini fotografiche.

Dopo tre mesi da ogni estrazione il paziente è stato richiamato per un controllo e si è proceduto alla carotazione del sito per poter prelevare il tessuto osseo e mucoso da inviare ai laboratori istologici.

Il prelievo è avvenuto con una fresa chirurgica trephine (diametro interno 3 mm) (Medesy srl, MANIAGO (PN) - ITALIA) con modalità trans-mucosa, prelevando contemporaneamente epitelio-connettivo-periostio e tessuto osso.

Figure 11-12

I campioni prelevati sono stati conservati in formalina tamponata al 10%, codificati e spediti all'Istituto di Anatomia Patologica dell'Università di Firenze. Gli istologi non sapevano a priori se il campione che trattavano per l'analisi derivasse da un intervento rigenerativo oppure no. Anche i biologi che hanno poi valutato i vetrini, non avevano idea della provenienza dei campioni. Ogni campione è stato valutato da tre istologi in separata sede, ed ognuno di essi non sapeva quale collega analizzava il suo stesso vetrino. Inoltre, a priori nessuno sapeva l'origine dell'istologia.

I campioni di tessuto, precedentemente fissati in formalina al 4%, sono stati decalcificati mediante incubazione per 21 giorni in una soluzione specifica (Sodium Formiate 0.76 M, Formic Acid 1.6M (Panreac Quimica, Barcelona Spain) in H₂O). Successivamente, i campioni sono stati disidratati in etanolo graduata ed inclusi in paraffina. Questa procedura di incorporazione e fissazione permette una rapida infiltrazione del tessuto ed il raggiungimento della giusta consistenza per il taglio. Con questa tecnica si riduce al minimo l'artefatto da restringimento, fornendo così una morfologia tissutale che è rappresentativa delle caratteristiche del tessuto in vivo. Le sezioni di tessuto, 5

micron di spessore, sono state raccolte su vetrini specifici per l'analisi istologica e colorati con ematossilina ed eosina.

Una volta osservato tutto il campione è stata eseguita la raccolta di microfotografie digitali in x35 di ingrandimento. Per una valutazione più fine sono stati, i campioni sono stati osservati con ingrandimento 100x.

7.3 Risultati

7.3.1. Campione di tessuto rigenerato

Il campione di tessuto rigenerato appare formato da epitelio pavimentoso composto nella sua faccia superiore.

Inferiormente al tessuto epiteliale si sviluppa un cospicuo tratto di tessuto connettivo fibroso che si continua anche nell'intorno delle spicole ossee sottostanti. Non si evidenziano gruppi di cellule riferibili a infiltrato infiammatorio. Nella porzione inferiore del campione si riportano alcune spicole ossee di tessuto decisamente basofilo e prive di osteociti nelle lacune ossee. Dette caratteristiche fanno interpretare questo tessuto come biomateriale residuo. Nelle vicinanze di questi frammenti si repertano spicole ossee francamente acidofile e dotate di osteociti. Detto tessuto lo si interpreta come tessuto osseo vitale. Lungo i bordi di alcuni frammenti sono visibili cellule interpretabili come osteoblasti. Alcune porzioni di tessuto osseo vitale sono in stretto rapporto di contiguità con il biomateriale residuo. **Figura 13**

7.3.2. Campione tessuto non rigenerato

Il campione di tessuto non rigenerato mostra una struttura epiteliale identica a quella presente nel precedente campione. Al di sotto dell'epitelio si sviluppa un tessuto connettivo fibroso del tutto identico a quello del campione precedente. Nella porzione inferiore del tessuto si repertano spicole di tessuto osseo vitale. Lungo alcuni bordi di dette spicole sono visibili alcuni osteoblasti. Il tessuto

connettivo presente tra le spicole appare abbondantemente vascolarizzato.

Figura 14

7.4. Discussione

7.4.1. Osso

Sono stati esaminati la presenza di osso neoformato, di particelle di biomateriale residue e l'interfaccia tra nuovo osso e innesto. In tutte le biopsie, nella zona dell'innesto osseo, si nota la formazione di osso trabecolare e la presenza di particelle di biomateriale residuo. Si può inoltre osservare che i granuli di biomateriale hanno dimensioni variabili. Queste dimensioni sono altamente variabili da piccole, parzialmente inglobate nell'area di rigenerazione ossea, a dimensioni decisamente più grosse. All'interno delle particelle e attorno alle stesse si nota osso neo-formato. Le particelle di materiale innestato presentano margini irregolari a causa del processo di riassorbimento a cui erano soggette. In molte sezioni sono state trovate cellule ossee all'interno dei pori delle particelle. A ingrandimento maggiore (100X), non sono rinvenuti gap all'interfaccia tra nuovo osso e biomateriale, e il nuovo osso è in stretto contatto con i granuli. L'osso neoformato, disposto a formare ponti tra le particelle di biomateriale, è caratterizzato da lacune osteocitiche di grosse dimensioni. Gli spazi midollari dell'osso neoformato contenevano un numero limitato di cellule stromali midollari e una rete vascolare. Non vi è alcuna cellula infiammatoria o cellule di reazione da corpo estraneo sulla superficie del biomateriale.

7.4.2. Tessuto molle

Non si notano differenze strutturali a livello del connettivo gengivale che ricopre l'alveolo. Questa situazione istologica non ci stupisce, infatti, se pensiamo che i prelievi sono stati effettuati a 3 mesi di distanza dalle estrazioni, è intuibile come il processo rigenerativo fisiologico dei pazienti abbia ricreato

una qualità di gengiva simile tra i due gruppi test (con rigenerazione) e controllo (senza rigenerazione).

Non vi è evidenza di alcuna cellula infiammatoria o cellule di reazione da corpo estraneo a livello del sito rigenerato. Questo è un ottimo segnale, considerando che la tecnica rigenerativa prevede una guarigione per seconda intenzione, dunque una esposizione continua della membrana in cavità orale.

Per quanto riguarda la qualità del tessuto gengivale trovato, non sono state rilevate differenze sostanziali. La differenza più evidente è legata allo sconfinamento del tessuto connettivo all'interno dell'alveolo nel campione ove non è stata fatta la rigenerazione. La buona separazione dei tessuti, legata ad una qualità e quantità sovrapponibili al tessuto fisiologico è un ottimo risultato. Infatti, questo va legato a ciò che il clinico vede durante le fasi di guarigione, ovvero una marcata ricrescita della gengiva nella zona rigenerata. Infatti, clinicamente la sensazione che si ha è quella di un tessuto che cresce "arrampicandosi" sopra la Xenomatrix (Bioteck s.p.a.). Il tutto conferma che realmente la Xenomatrix (Bioteck s.p.a.) funge da scaffold, o meglio da guida, per la crescita dei fibroblasti.

7.5. Conclusioni

I risultati istologici hanno evidenziato che l'innesto appare integrato dal momento che all'interno delle particelle ed attorno ad esse si osserva osso neoformato.

Non vi è evidenza di alcuna cellula infiammatoria o cellule di reazione da corpo estraneo a livello del sito rigenerato. Questo è un ottimo segnale, considerando che la tecnica rigenerativa prevede una guarigione per seconda intenzione, dunque una esposizione continua della membrana in cavità orale.

Oltre a ciò si nota un buona compartimentalizzazione dei tessuti che è un aspetto che noi riteniamo positivo dato che il connettivo osseo rimane separato dal connettivo gengivale.

Sarebbe interessante poter ampliare il campione di studio ed effettuare anche una valutazione morfometrica dei siti estrattivi servendoci di cone beam computed tomography (tomografia computerizzata cone beam).

7.6 Immagini dello studio sperimentale



Figura 1: Radiografia panoramica



Figura 2: elementi da estrarre 3.6, 3.7

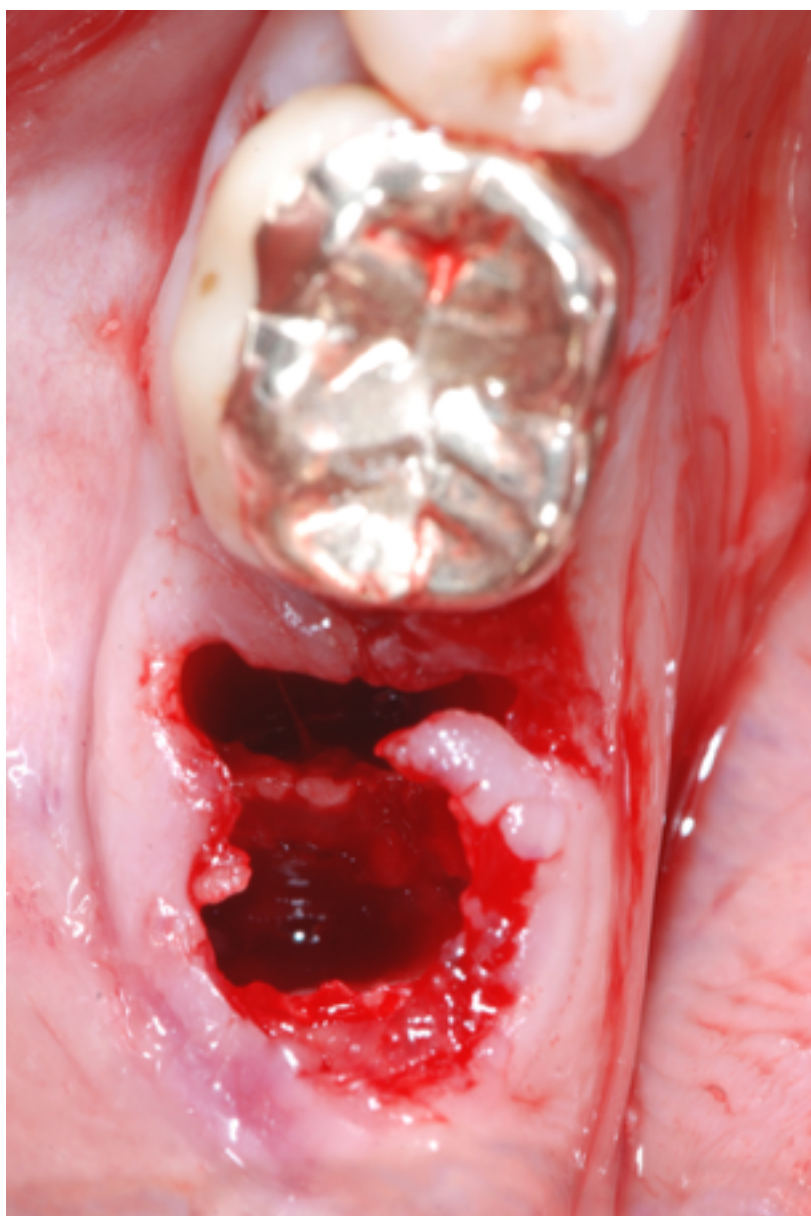


Figura 3: elemento 3.7 estratto. Alveolo Test



Figura 4a (Xenomatrix)



Figura 4b, (Xenomatrix preparata per il sito)

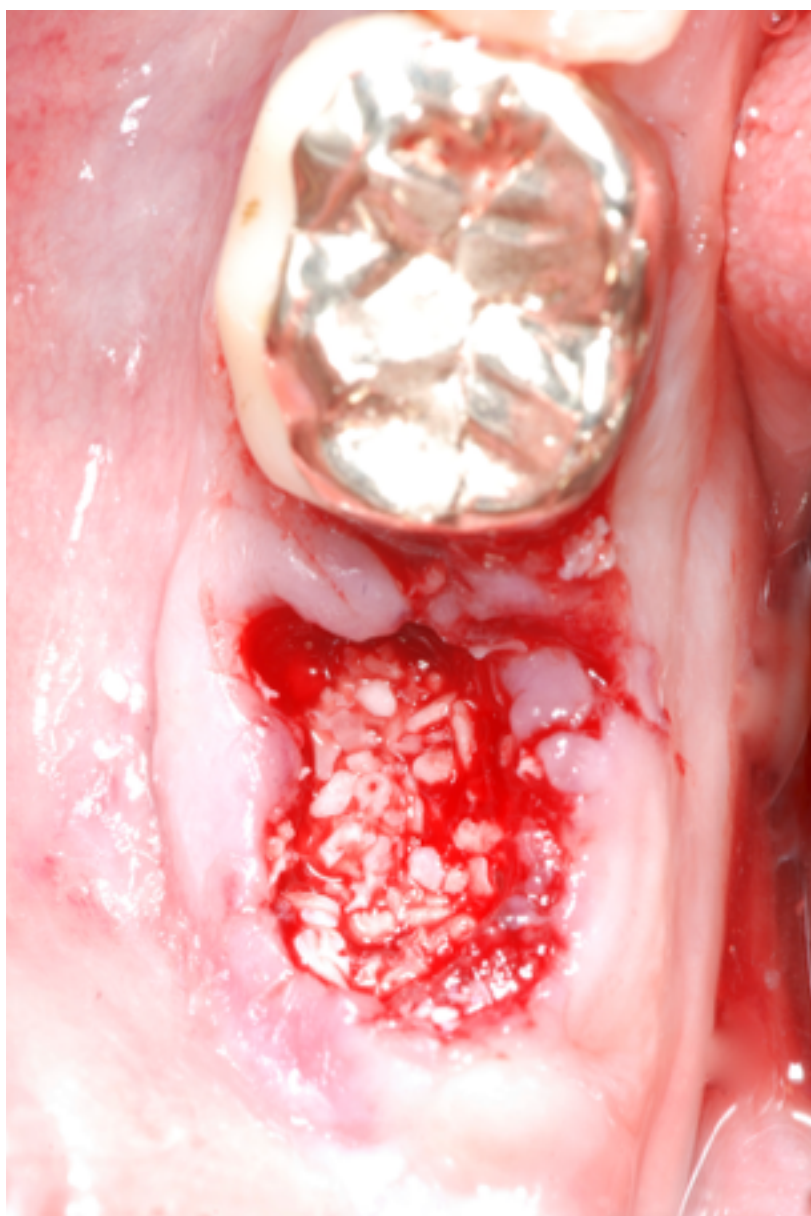


Figura 5: Alveolo Test riempito con Ox31 Bioteck

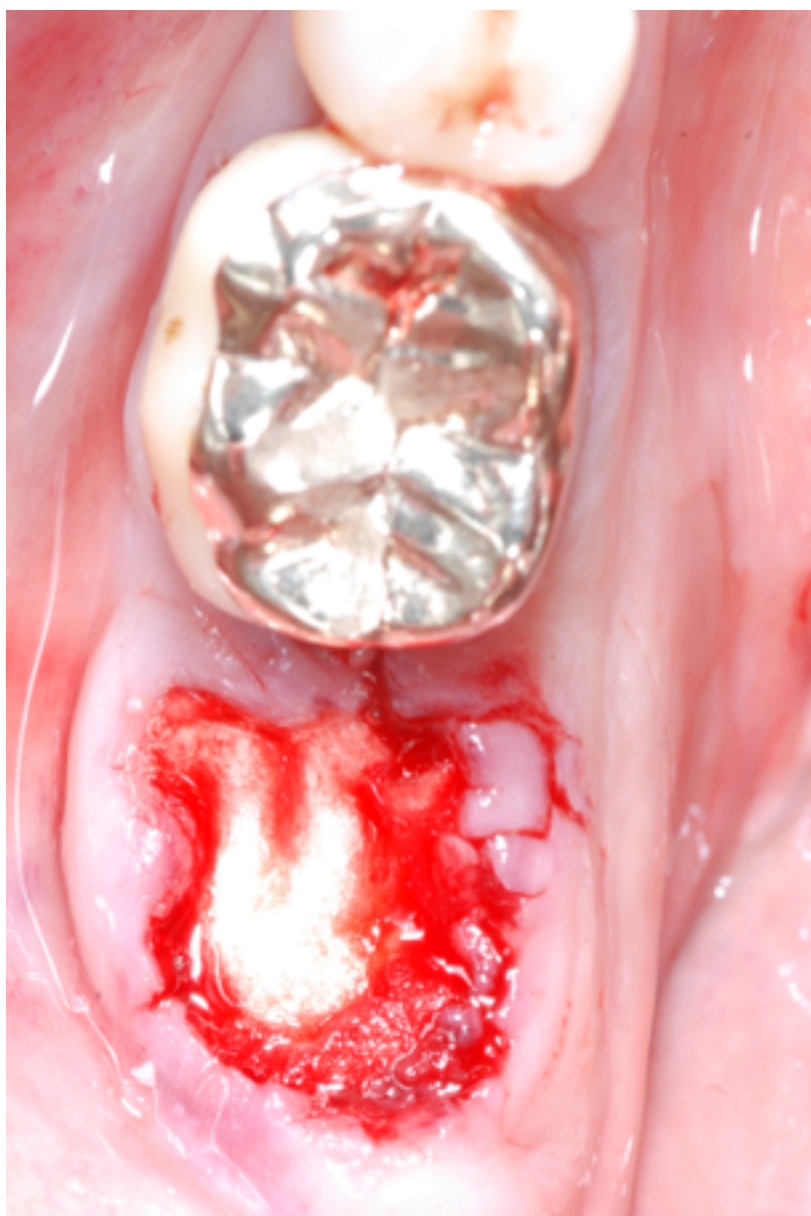


Figura 6: Applicazione di un primo strato di Xenomatrix nel sito Test



Figura 7: Applicazione di un secondo strato di Xenomatrix nel sito Test



Figura 8: sutura



Figura 9: guarigione del sito Test dopo una settimana



Figura 10a: guarigione del sito Test dopo 4 settimane



Figura 10b: estrazione di 3.6, (sito Controllo)

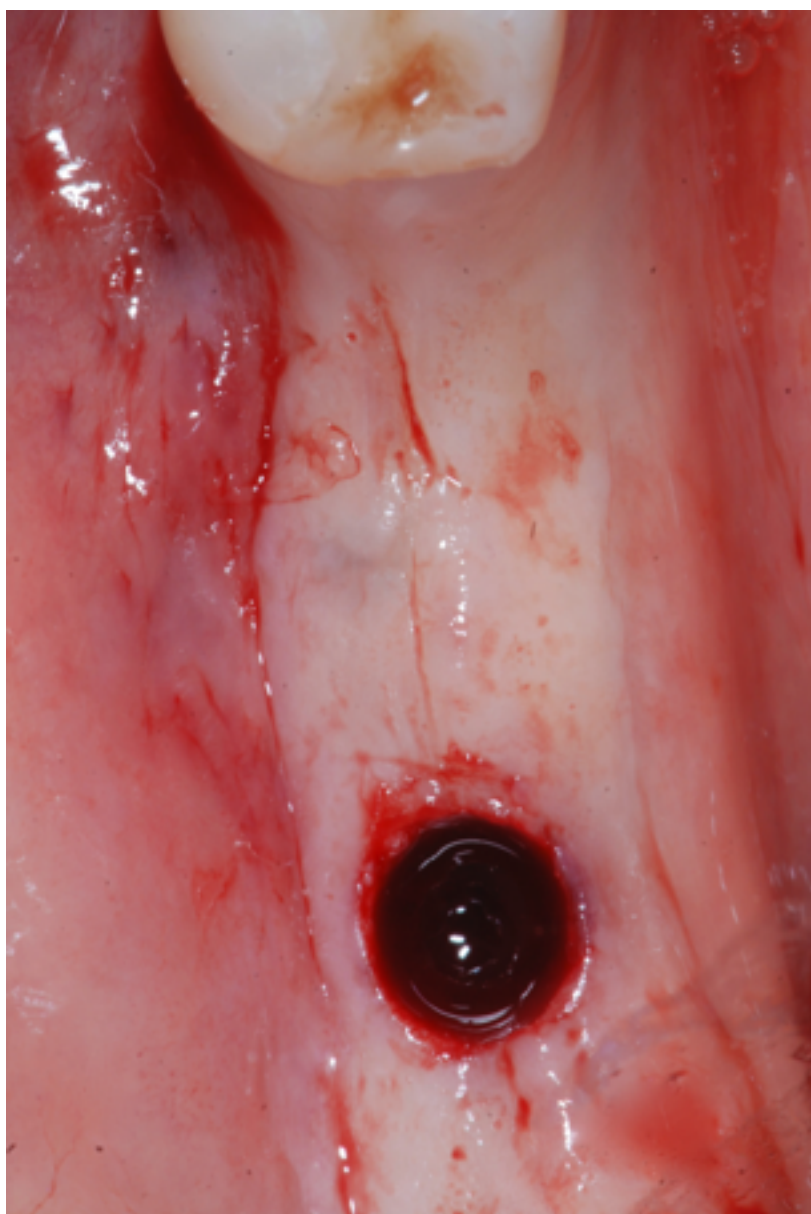


Figura 11: prelievo di campione tissutale dall'alveolo Test dopo 3 mesi dall'estrazione.

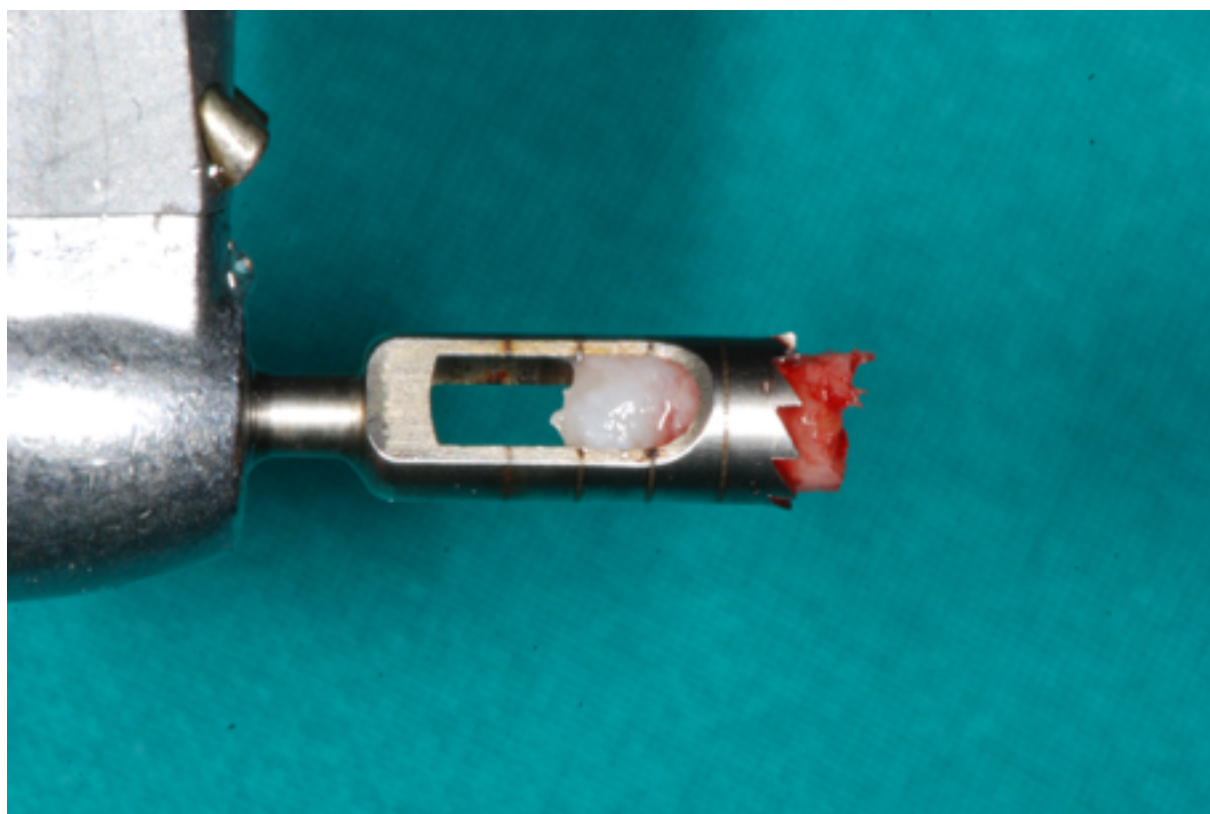


Figura 12: campione tissutale dell'alveolo Test

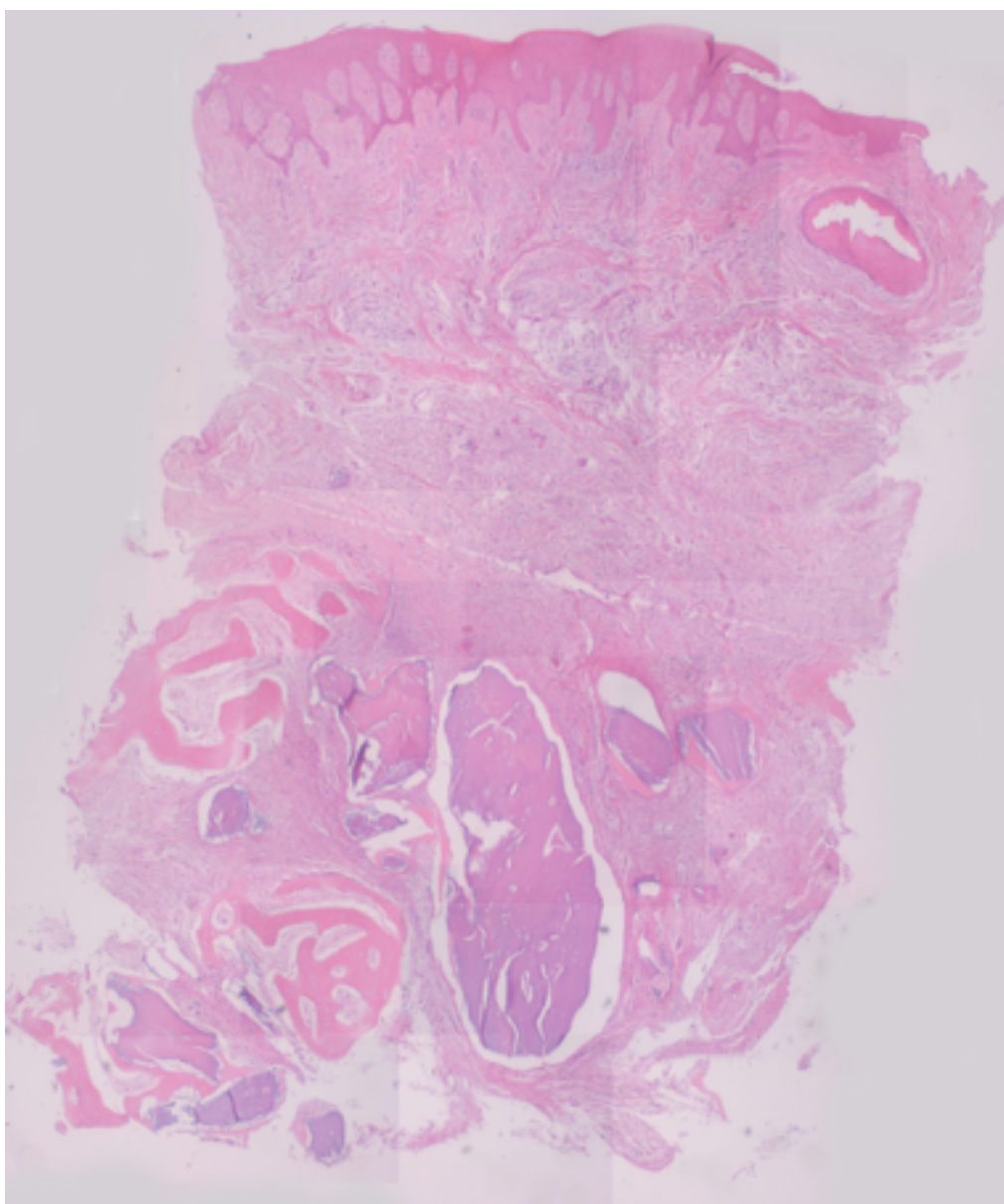


Figura 13: istologia dell'alveolo rigenerato (Test) (ingrandimento 100X; preparato con ematossilina eosina)



Figura 14: istologia dell'alveolo non rigenerato (Controllo) (ingrandimento 100X; preparato con ematossilina eosina)

BIBLIOGRAFIA

1. Simpson HE. Experimental investigation into the healing of extraction wounds in macacus rhesus monkeys. J Oral Surg Anesth Hosp Dent Serv 1960;39:1-9.
2. Kuboki Y, Hashimoto F, Ishibashi K. Time-dependent changes of collagen crosslinks in the socket after tooth extraction in rabbits. J Dent Res 1988;67:944-8.
3. Lin WL, McCulloch CA, Cho MI. Differentiation of periodontal ligament fibroblasts into osteoblasts during socket healing after tooth extraction in the rat. Anat Rec 1994;249:492-506.
4. Mangos JF. The healing of extraction wounds. New Zealand DJ 1941;37:4-10.
5. Amler MH, Johnson PL, Salman I. Histological and Histochemical Investigation of Human Alveolar Socket Healing in Undisturbed Extraction Wounds. J Am Dent A 1960;61:32-44.
6. Cardaropoli G, Araujo M, Lindhe J. Dynamics of bone tissue formation in tooth extraction sites. An experimental study in dogs. J Clin Periodontal 2003;30:809-18.
7. Boëck-Neto RJ, Artese L, Piattelli A, Shibli JA, Perrotti V, Piccirilli M, Marcantonio E Jr. VEGF and MVD expression in sinus augmentation with autologous bone and several graft materials. Oral Dis. 2009 Mar;15(2):148-54
8. Simion M, Rocchietta I, Dellavia C. Three-dimensional ridge augmentation with xenograft and recombinant human platelet-derived growth factor-BB in humans: report of two cases. Int J Periodontics Restorative Dent. 2007 Apr;27(2):109-15.

9. Garcia P, Schwenzer S, Slotta JE, Scheuer C, Tami AE, Holstein JH, Histing T, Burkhardt M, Pohlemann T, Menger MD. Inhibition of angiotensin-converting enzyme stimulates fracture healing and periosteal callus formation - role of a local renin-angiotensin system. *Br J Pharmacol*. 2010 Apr;159(8):1672-80.
10. Matsumoto T, Kuroda R, Mifune Y, Kawamoto A, Shoji T, Miwa M, Asahara T, Kurosaka M. Circulating endothelial/skeletal progenitor cells for bone regeneration and healing. *Bone*. 2008 Sep;43(3):434-9. Epub 2008 May 10.
11. Aubin JE, Heersche JNM (2002). Bone cell biology: Osteoblasts, Osteocytes and Osteoclasts. In "Pediatric Bone" (FH Glorieux, JM Pettifor and M Jueppner eds.), pp. 43-75. Academic Press. San Diego.
12. Miller SC, de Saint-Georges L, Bowman BM, Jee WS. Bone lining cells: structure and function. *Scanning Microsc*. 1989 Sep;3(3):953-60; discussion 960-1.
13. Costello BJ, Shah G, Kumta P, Sfeir CS. Regenerative medicine for craniomaxillofacial surgery. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am*. 2010 Feb;22(1):33-42.
14. Kadler K. Matrix loading: assembly of extracellular matrix collagen fibrils during embryogenesis. *Birth Defects Res C Embryo Today*. 2004 Mar;72(1):1-11.
15. Kuc IM, Scott PG. Increased diameters of collagen fibrils precipitated in vitro in the presence of decorin from various connective tissues. *Connect Tissue Res*. 1997;36(4):287-96
16. Vogel KG, Trotter JA. The effect of proteoglycans on the morphology of collagen fibrils formed in vitro. *Coll Relat Res*. 1987 Jun;7(2):105-14.
17. Marino AA, Becker RO. Evidence for epitaxy in the formation of collagen and apatite. *Nature*. 1970 May 16;226(5246):652-3.

18. Baslé MF, Lesourd M, Grizon F, Pascaretti C, Chappard D. Type I collagen in xenogenic bone material regulates attachment and spreading of osteoblasts over the beta1 integrin subunit. *Orthopade*. 1998 Feb;27(2):136-42
19. Sampath TK, Reddi AH. Dissociative extraction and reconstitution of extracellular matrix components involved in local bone differentiation. *PNAS* 1981 Dec;78(12):7599-603
20. Toroian D, Lim JE, Price PA. The size exclusion characteristics of type I collagen: implications for the role of noncollagenous bone constituents in mineralization. *J Biol Chem*. 2007 Aug 3;282(31):22437-47.
21. Paralkar VM, Nandedkar AK, Pointer RH, Kleinman HK, Reddi AH. Interaction of osteogenin, a heparin binding bone morphogenetic protein, with type IV collagen. *J Biol Chem*. 1990 Oct 5;265(28):17281-4.
22. Green J, Schotland S, Stauber DJ, Kleeman CR, Clemens TL. Cell-matrix interaction in bone: type I collagen modulates signal transduction in osteoblast-like cells. *Am J Physiol*. 1995 May;268(5 Pt 1): C1090-103.
23. Liu G, Hu YY, Zhao JN, Wu SJ, Xiong Z, Lu R. Effect of type I collagen on the adhesion, proliferation, and osteoblastic gene expression of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Chin J Traumatol*. 2004 Dec;7(6):358-62.
24. Gungormus M, Kaya O. Evaluation of the effect of heterologous type I collagen on healing of bone defects. *J Oral Maxillofac Surg*. 2002 May;60(5):541-5.
25. Gungormus M. The effect on osteogenesis of type I collagen applied to experimental bone defects. *Dent Traumatol*. 2004 Dec;20(6):334-7.
26. Regazzoni C, Winterhalter KH, Rohrer L. Type I collagen induces expression of bone morphogenetic protein receptor type II. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001 May 4;283(2):316-22.

27. Parfitt AM. The cellular basis of bone turnover and bone loss: a rebuttal of the osteocytic resorption--bone flow theory. *Clin Orthop Relat Res.* 1977; (127):236-47.
28. Manolagas SC. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev.* 2000 Apr;21(2):115-37.
29. Marotti G, Cane V, Palazzini S, Palumbo C. Structure-function relationship in the osteocyte. *Ital. J. Min. Electro. Metab.* 1990; 4:93-106
30. Johnson LC. The kinetics of skeletal remodeling in structural organization of the skeleton. *Birth Defects.* 1966; 11: 66-142
31. Bilezikian JP, Raisz LG, Martin TJ, eds. *Principles of Bone Biology.* 3rd ed. San Diego, CA: Elsevier / Academic Press, 2008
32. Smit TH, Burger EH. Is BMU-coupling a strain-regulated phenomenon? A finite element analysis. *J Bone Miner Res.* 2000 Feb;15(2):301-7.
33. Parfitt AM. Targeted and nontargeted bone remodeling: relationship to basic multicellular unit origination and progression. *Bone.* 2002 Jan;30(1): 5-7
34. Nesbitt S, Nesbit A, Helfrich M, Horton M. Biochemical characterization of human osteoclast integrins. Osteoclasts express alpha v beta 3, alpha 2 beta 1, and alpha v beta 1 integrins. *J Biol Chem.* 1993 Aug 5;268(22): 16737-45.
35. Lakkakorpi P, Tuukkanen J, Hentunen T, Järvelin K, Väänänen K. Organization of osteoclast microfilaments during the attachment to bone surface in vitro. *J Bone Miner Res.* 1989 Dec;4(6):817-25.
36. Fallon MD. Bone resorbing fluid from osteoclasts is acidic: an in vitro micropuncture study. In "Endocrine Control of Bone and Calcium Metabolism" (Conn CV, Fujita JR, Potts JR et al. eds.) ; pp. 144-146. (1984) Elsevier / North Holland, Amsterdam

37. Everts V, Korper W, Hoeben KA, Jansen ID, Bromme D, Cleutjens KB, Heeneman S, Peters C, Reinheckel T, Saftig P, Beertsen W. Osteoclastic bone degradation and the role of different cysteine proteinases and matrix metalloproteinases: differences between calvaria and long bone. *J Bone Miner Res.* 2006 Sep;21(9):1399-408.
38. Fuller K, Kirstein B, Chambers TJ. Regulation and enzymatic basis of bone resorption by human osteoclasts. *Clin Sci (Lond).* 2007 Jun;112(11):567-75.
39. Saltel F, Chabadel A, Bonnelye E, Jurdic P. Actin cytoskeletal organisation in osteoclasts: a model to decipher transmigration and matrix degradation. *Eur J Cell Biol.* 2008 Sep;87(8-9):459-68.
40. Del Fabbro M, Rosano G, Taschieri S. Implant survival rates after maxillary sinus augmentation. *Eur J Oral Sci.* 2008 Dec;116(6):497-506.
41. Del Fabbro M, Testori T, Francetti L, Weinstein R. Systematic review of survival rates for implants placed in the grafted maxillary sinus. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 2004 Dec;24(6):565-77.
42. Aghaloo TL, Moy PK. Which hard tissue augmentation techniques are the most successful in furnishing bony support for implant placement? *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2007;22 Suppl:49-70.
43. Viscioni A, Franco M, Paolin A, Cogliati E, Callegari M, Zollino I, Sollazzo V, Carinci F. Effectiveness of fresh frozen and cryopreserved homologue iliac crest grafts used in sinus lifting: a comparative study. *Cell Tissue Bank.* 2010 Jul 6.
44. Eppley BL, Pietrzak WS, Blanton MW. Allograft and alloplastic bone substitutes: a review of science and technology for the craniomaxillofacial surgeon. *J Craniofac Surg.* 2005 Nov;16(6):981-9.
45. Moreau MF, Gallois Y, Baslé MF, Chappard D. Gamma irradiation of human bone allografts alters medullary lipids and releases toxic compounds for osteoblast-like cells. *Biomaterials.* 2000 Feb;21(4):369-76.

46. Endres S, Kratz M, Heinz M, Herzberger C, Reichel S, von Garrel T, Gotzen L, Wilke A. Biocompatibility testing of different sterilised or disinfected allogeneous bone grafts in comparison to the gold standard of autologous bone grafts--an "in vitro" analysis of immunomodulation. *Z Orthop Ihre Grenzgeb.* 2005 Nov-Dec;143(6):660-8.
47. Endres S, Kratz M. Gamma irradiation. An effective procedure for bone banks, but does it make sense from an osteobiological perspective? *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2009 Jan-Mar;9(1):25-31.
48. Mangano C, Scarano A, Perrotti V, Iezzi G, Piattelli A. Maxillary sinus augmentation with a porous synthetic hydroxyapatite and bovine-derived hydroxyapatite: a comparative clinical and histologic study. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2007 Nov-Dec;22(6):980-6.
49. Thomas MV, Puleo DA, Al-Sabbagh M. Bioactive glass three decades on. *J Long Term Eff Med Implants.* 2005;15(6):585-97.
50. Wilson T, Parikka V, Holmbom J, Ylanen H, Penttinen R. Intact surface of bioactive glass S53P4 is resistant to osteoclastic activity. *J Biomed Mater Res A.* 2006 Apr;77(1):67-74
51. Zaffe D, Leghissa GC, Pradelli J, Botticelli AR. Histological study on sinus lift grafting by Fisiograft and Bio-Oss. *J Mater Sci Mater Med.* 2005 Sep;16(9):789-93.
52. Scarano A, Degidi M, Iezzi G, Pecora G, Piattelli M, Orsini G, Caputi S, Perrotti V, Mangano C, Piattelli A. Maxillary sinus augmentation with different biomaterials: a comparative histologic and histomorphometric study in man. *Implant Dent.* 2006 Jun;15(2):197-207.
53. Weiner S, Wagner HD . The material bone: Structure-Mechanical Function Relations. *Annual Review of Materials Science*, August 1998, Vol. 28, 271-298

54. Kim SG, Park JS, Lim SC. Placement of implant after bone graft using J block allograft. *Implant Dent*. 2010 Feb;19(1):21-8.
55. Sartori S, Silvestri M, Forni F, Icaro Cornaglia A, Tesei P, Cattaneo V. Ten-year follow-up in a maxillary sinus augmentation using anorganic bovine bone. A case report with histomorphometric evaluation. *Clin Oral Implants Res*. 2003 Jun;14(3):369-72.
56. Perrotti V (1), Nicholls BM, Horton MA, Piattelli A. Human osteoclast formation and activity on a xenogenous bone mineral. *J Biomed Mater Res A*. 2009 Jul;90(1):238-46.
57. Perrotti V (2), Nicholls BM, Piattelli A. Human osteoclast formation and activity on an equine spongy bone substitute. *Clin Oral Implants Res*. 2009 Jan;20(1):17-23.
58. Di Stefano DA, Artese L, Iezzi G, Piattelli A, Pagnutti S, Piccirilli M, Perrotti V. Alveolar ridge regeneration with equine spongy bone: a clinical, histological, and immunohistochemical case series. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2009 Jun;11(2):90-100.
59. Stievano D, Di Stefano A, Ludovichetti M, Pagnutti S, Gazzola F, Boato C, Stellini E. Maxillary sinus lift through heterologous bone grafts and simultaneous acid-etched implants placement. Five year follow-up. *Minerva Chir*. 2008 Apr;63(2):79-91.
60. De Biase A, Guerra F, Cipriano L, Lamazza L, Tucci E. Subantral filling by deantigenated heterologous bone and immediate fixture placement. *Minerva Stomatol*. 2005 Jan-Feb;54(1-2):99-108.
61. Bedini R, Ioppolo I, Pecci R, Filippini P, Caiazza S, Bianco A, Columbro G. Rapporto dell'Istituto Superiore della Sanità n. 05/37 - Osservazioni di osso equino al microscopio elettronico a scansione e alla Microtomografia 3D (2005).

62. Sessa G, Costarella I, Pavone V, Graceffa A, Evola G, Evola FR. Equine bone tissue in acetabular revision: our experience. *Minerva Ort. E Traumat.* 61(6):469-476.
63. Ludovichetti M, Di Stefano DA, Pagnutti S, Vaccari E, Ludovichetti FS, Celletti R. Vertical ridge augmentation using a flexible heterologous cortical bone sheet: three-year follow-up. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 2011 Jul-Aug;31(4):401-7.
64. Di Stefano DA, Vinci R, Cremaschini G, Pagnutti S, Gherlone EF. GBR perimplantare con lamina corticale flessibile di origine equina e osso eterologo equino. *IOS* 2011 10(1):5-14.
65. Gottlow J, Nyman S, Lindhe J, Karring T, Wennström J. New attachment formation in the human periodontium by guided tissue regeneration. Case reports. *J Clin Periodontol.* 1986 Jul;13(6):604-16.
66. Nyman S, Gottlow J, Karring T, Lindhe J. The regenerative potential of the periodontal ligament. An experimental study in the monkey. *J Clin Periodontol.* 1982 May;9(3):257-65.
67. Roos-Jansaker AM, Renvert H, Lindahl C, Renvert S. Surgical Treatment of peri-implantitis using a bone substitute with or without a resorbable membrane: a prospective cohort study. *J Clin Periodontol* 2007;34(7):625-632.
68. Hench LL. () An investigation of bonding mechanism at the interface of prosthetic materials. Report N° 3 1972.
69. Hockers T, Abensur D, Valentini P, Legrand R, Hammerle CH. The combined use of bioresorbable membranes and xenografts or autografts in the treatment of bone defects around implants. A study in beagle dogs. *Clinical Oral Implants Research* 1999;6:487-498.
70. Hugoson A, Ravald N, Fornell J, Johard G, Teiwik A, Gottlow J. Treatment of class II furcation involvements in human with bioresorbable

- and nonresorbable guided tissue regeneration barriers. A randomized multicenter study. *Journal of Periodontology* 1995;66:624-634.
71. Cortellini P, Pini Prato G, Tonetti M. Long term stability of clinical attachment following guided tissue regeneration and conventional therapy. *Journal of Clinical Periodontology* 1996a;23:106-111.
 72. Larjava H, Koivisto L, Hakkinen L, Heino J. "Epithelial integrins with special reference to oral epithelia". *J Dent Res*. 2011 Dec;90(12):1367-76. Epub 2011 Mar 25.
 73. Bragger U, Burgin W, Hammerle CHF, Lang NP, "Associations between clinical parameters assessed around implants and teeth" *Clin. Oral Impl. Res*. 1997;8: 412-421.
 74. Dietmar Weng, Josè Hitomi Nagata, Luiz Gustavo Nascimento de Melo, Alvaro Francisco Bosco, "Influence of Microgap Location and Configuration on Peri-implant Bone Morphology in Nonsubmerged Implants: An Experimental Study in Dogs". *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2010 May-Jun;25(3):540-7.
 75. Tarnow DP, Cho SC, Wallace SS. The effect of inter-implant distance on the height of inter-implant bone crest. *J Periodontol*. 2000;71:546–9
 76. Tinti C, Parma-Benfenati S. Minimally invasive technique for gingival augmentation around dental implants. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2012 Apr;32(2):187-93.
 77. Kois JC. Aesthetic extraction site development: The biologic variables. *Contem Aesthet Resto Pract*. 1998;2:10–8.
 78. Hardwick, R., Scantlebury, T.V., Sanchez, R., Whitley, N. & Ambruster, J. Membrane design criteria for guided bone regeneration of the alveolar ridge In: *Guided Bone Regeneration in Implant Dentistry*. Chicago, Berlin: Quintessence. 1994; pp. 101–136.

79. Friedmann, A., Strietzel, F. P., Maretzki, B., Pitaru, S. & Bernimoulin, JP. Histological assessment of augmented jaw bone utilizing a new collagen barrier membrane compared to a standard barrier membrane to protect a granular bone substitute material. *Clinical Oral Implants Research*. 2002; 13, 587-594.
80. Moses, O., Pitaru, S., Artzi, Z. & Nemcovsky, C. Healing of dehiscence-type defects in implants placed together with different barrier membranes: a comparative clinical study. *Clinical Oral Implants Research*. 2005; 16, 210–219.
81. Lekovic, V., Kenney, E.B., Weinlaender, M., Han, T., Klokkevold, P.R., Nedic, M. & Orsini, M. A bone regenerative approach to alveolar ridge maintenance following tooth extraction. Report of 10 cases. *Journal of Periodontology*. 1997;68, 563–570.
82. Lekovic, V., Camargo, P.M., Klokkevold, P.R., Weinlaender, M., Kenney, E.B., Dimitrijevic, B. & Nedic, M. (Preservation of alveolar bone in extraction sockets using bioabsorbable membranes. *Journal of Periodontology*. 1998; 69, 1044–1049.
83. Locci P, Calvitti M, Belcastro S, Pugliese M, Guerra M, Marinucci L, Staffolani N, Becchetti E. Moses, O. Phenotype expression of gingival fibroblasts cultured on membranes used in guided tissue regeneration. *Journal of Periodontology*. 1997; 68 (9), 857-863.
84. Zitzmann, N.U., Naef, R. & Schärer, P. Resorbable versus nonresorbable membranes in combination with Bio- Oss for guided bone regeneration. *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*. 1997; 12, 844–852.
85. Johns LP, Merritt K, Agarwal S, Ceravolo FJ. Immunogenicity of a bovine collagen membrane in guided tissue regeneration. *J Dent Res*. 1992;71(Spec. Issue):298 (Abstr. 1538).

86. Wang H-L, O'Neal RB, Thomas CL, Shyr Y, MacNeil RL. Evaluation of an absorbable collagen membrane in treating class II furcation defects. *J Periodontol.* 1994; 65:1029-1036.
87. Schlegel AK, Möhler H, Busch F, Mehl A. Preclinical and clinical studies of a collagen membrane (Bio-Gide). *Biomaterials.* 1997;18:535-538.
88. Postlethwaite AE, Seyer JM, Kang AH. Chemotactic attraction of human fibroblasts to type I, II, and III collagens and collagen-derived peptides. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1978; 75:871-5.
89. Yaffe A, Ehrlich J, Shoshan S. Restoration of periodontal attachment employing enriched collagen solution in the dog. *J Periodontol.* 1984; 55:623-8.
90. Tal, H., Kozlovsky A, Artzi Z., Nemcovsky, C.E. , Moses O. Long term biodegradation of cross-linked and non-cross-linked collagen barriers in human guided bone regeneration *Clinical Oral Implants Res.* 2008; 19:295-302.
91. Speer DP, Chvapil M, Eskelson CD, Ulreich J. Biological effects of residual glutaraldehyde in glutaraldehydetanned collagen biomaterials. *J Biomed Mater Res.* 1980;14:753-764.
92. Kozlovsky A, Aboodi G, Moses O, Tal H, Artzi Z, Weinreb M, Nemcovsky CE. Biodegradation of a resorbable collagen membrane (Bio-Gide) applied in a doublelayer technique in rats. *Clin Oral Implants Res.* 2009; Oct; 20(10):1116-23.
93. Moses, O, Nemcovsky CE, Tal H, Zohar R. Tetracycline modulates collagen membrane degradation in vitro. *J Periodontol.* 2001; 72:1588-93.
94. Golub LM, McNamara TF, D'Angelo G, Greenwald RA, Ramamurthy NS. A nonantibacterial chemically-modified tetracycline inhibits mammalian collagenase activity. *J Dent Res.* 1987; 7;66:1310-4.

95. Greenwald RA, Golub LM, Ramamurthy NS, Chowdhury M, Moak SA, Sorsa T. In vitro sensitivity of the three mammalian collagenases to tetracycline inhibition: relationship to bone and cartilage degradation. *Bone*. 1998; 22:33-8
96. Di Stefano DA, Andreasi Bassi M, Cinci L, Pieri L, Ammirabile G. Treatment of a bone defect consequent to the removal of a periapical cyst with equine bone and equine membranes: clinical and histological outcome. *Minerva Stomatologica*. 2012a; 6 (11-12): 477-490.
97. Di Stefano DA, Andreasi Bassi M, Ludovichetti M, Pagnutti S. Maxillary sinus lift with a collagenic equine heterologous bone substitute. Histomorphometric analysis. *Italian Oral Surgery*. 2012b; 11(5)1: 56-62.
98. Caffesse RG, de la Rosa M, Mota LF. Regeneration of soft and hard tissue periodontal defects. *Am J Dent*. 2002; 15 (5): 339-345.
99. Steigmann M. Pericardium membrane and xenograft particulate grafting materials for horizontal alveolar ridge defects. *Implant Dentistry*. 2006; 15 (2): 186-191.
100. Jan Lindhe. *Clinical Periodontology and Implant Dentistry*. Blackwell Munksgaard, a Blackwell Publishing Company (Fourth Edition) 2003
101. Shahrokh C. Bagheri, Bryan Bell, Husain Ali Khan. *Current Therapy In Oral and Maxillofacial*. St. Louis, Missouri: Saunders Elsevir 2012
102. Cardaropoli, G., Araujo, M. & Lindhe, J. (2003) Dynamics of bone tissue formation in tooth extraction sites. An experimental study in dogs. *Journal of Clinical Periodontology* 30: 809–818.
103. Kuboki, Y., Hashimoto, F. & Ishibashi, K. (1988) Time-dependent changes of collagen crosslinks in the socket after tooth extraction in rabbits. *Journal of Dental Research* 67: 944–948.

104. Araujo, M.G. & Lindhe, J. (2005) Dimensional ridge alterations following tooth extraction: an experimental study in the dog. *Journal of Clinical Periodontology* 32: 212–218.
105. Van Kesteren, C.J., Schoolfield, J., West, J. & Oates, T. (2010) A prospective randomized clinical study of changes in soft tissue position following immediate and delayed implant placement. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* 25: 562–570.
106. Amler, M.H., Johnson, P.L. & Salman, I. (1960) Histological and histochemical investigation of human alveolar socket healing in undisturbed extraction wounds. *Journal of the American Dental Association* 61: 32–44.
107. Evian, C.I., Rosenberg, E.S., Coslet, J.G. & Corn, H. (1982) The osteogenic activity of bone removed from healing extraction sockets in humans. *Journal of Periodontology* 53: 81–85.
108. Devlin, H. & Sloan, P. (2002) Early bone healing events in the human extraction socket. *The International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 31: 641–645.
109. Trombelli, L., Farina, R., Marzola, A., Bozzi, L., Liljenberg, B. & Lindhe, J. (2008) Modeling and remodeling of human extraction sockets. *Journal of Clinical Periodontology* 35: 630–639.
110. Schropp, L., Wenzel, A., Kostopoulos, L. & Karring, T. (2003) Bone healing and soft tissue contour changes following single-tooth extraction: a clinical and radiographic 12-month prospective study. *The International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry* 23: 313–323.
111. Lekovic, V., Camargo, P.M., Klokkevold, P.R., Weinlaender, M., Kenney, E.B., Dimitrijevic, B. & Nedic, M. (1998) Preservation of alveolar bone in extraction sockets using bioabsorbable membranes. *Journal of Periodontology* 69: 1044– 1049.

112. Camargo, P.M., Lekovic, V., Weinlaender, M., Klokkevold, P.R., Kenney, E.B., Dimitrijevic, B., Nedic, M., Jancovic, S. & Orsini, M. (2000) Influence of bioactive glass on changes in alveolar process dimensions after exodontia. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics* 90: 581–586.
113. Polimeni G, Koo KT, Qahash M, Xiropaidis AV, Albandar JM, Wikesjo UME. Prognostic factors for alveolar regeneration: effect of a space-providing biomaterial on guided tissue regeneration. *J Clin Periodontol* 2004;31:725–9.
114. Fickl, S., Zuhr, O., Wachtel, H., Bolz, W. & Huerzeler, M. (2008a) Tissue alterations after tooth extraction with and without surgical trauma: a volumetric study in the beagle dog. *Journal of Clinical Periodontology* 35: 356–363.
115. Fickl, S., Zuhr, O., Wachtel, H., Stappert, C.F., Stein, J.M. & Hurzeler, M.B. (2008b) Dimensional changes of the alveolar ridge contour after different socket preservation techniques. *Journal of Clinical Periodontology* 35: 906–913.
116. Darby I, Chen ST, Buser D. Ridge preservation techniques for implant therapy. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2009;24 Suppl:260-71.

