

# UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MESSINA

# DIPARTIMENTO DI MEDICINA CLINICA E SPERIMENTALE

# CORSO DI DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE BIOMEDICHE CLINICHE E SPERIMENTALI

# - XXXII CICLO -

Coordinatore: Chiar.mo Prof. Francesco Squadrito

# L'uso degli scaffold nella rigenerazione dei difetti ossei: sviluppo dei sistemi di customizzazione nelle tecniche sottrattive

Dottorando:

**Dr. Roberto Lo Giudice** 

Tutor: **Prof.ssa Giuseppina Cutroneo** 

Anno Accademico 2018-19

# Indice

Introduzione	3
Biomateriali	4
Progetto di ricerca	6
1. Valutazione sperimentale degli effetti di vari strumenti di taglio	
sulla morfologia di scaffold di osso eterologo	7
Materiali e metodi	8
Risultati	10
Discussione e conclusione	14
2. Valutazione sperimentale degli effetti della sterilizzazione	
in autoclave su blocchi di osso equino collagenato	15
Materiali e metodi	15
Risultati	17
Discussione e conclusione	23
3. Valutazione preliminare della modellazione di scaffold	
di osso equino collagenato con fresatori cnc.	24
Materiali e metodi	25
Risultati	26
Discussione e conclusione	26
4. Impact e implicazioni traslazionale complessive delle ricerche condotte	27
Bibliografia	28

#### Introduzione

#### La rigenerazione ossea

I difetti ossei, congeniti o causati da processi patologici, traumatici o chirurgici, sovente non guariscono spontaneamente e costituiscono una sfida clinica in molte pratiche chirurgiche per la limitata capacità di rigenerazione del tessuto osseo.

In letteratura sono riportati casi di guarigione spontanea di grandi difetti ossei, ma si tratta di eventi rari, non predicibili in termini statistici e riferibili ad anomalie genetiche in associazione a co-fattori locali. (1)

Le possibilità terapeutiche attualmente utilizzate comprendono l'uso di innesti autologhi di osso cortico-spongioso, il trapianto omologo di osso di banca, oppure l'utilizzo di materiali sintetici osteoconduttivi innestati localmente da soli o associati a tessuto osseo autologo.

I materiali da riempimento devono aver come requisito fondamentale la biocompatibilità, le proprietà di osteointegrazione (la capacità di legarsi chimicamente alla superficie di osso senza uno strato intermedio di tessuto fibroso) e osteoconduzione (la superficie del materiale da innesto osseo serve come impalcatura per la nuova crescita ossea). (2)

Tuttavia, sono richieste anche caratteristiche di osteoinduzione (la capacità di indurre la differenziazione delle cellule mesenchimali dai tessuti circostanti a differenziarsi in cellule progenitrici nelle due linee cellulari dell'osso), e osteogenesi (formazione di nuovo osso da osteoblasti vitali presenti nel materiale di innesto) (tab.1). Questi meccanismi vengono sfruttati quando si prevede che il biomateriale biodegradabile riempia temporaneamente il difetto con lo scopo di stimolare la formazione di nuovo osso. (2)

È stato dimostrato che, per piccoli difetti ossei, ove i tessuti molli costituiscano una copertura adeguata, il gap osseo può essere trattato con convenzionale innesto osseo autologo spugnoso o sostituti. (3)

Il "gold standard" per quanto riguarda osteoconduttività ed osteoinduttività rimane l'osso autologo, ma nei casi in cui non fosse possibile eseguire prelievi o si volesse seguire i trend internazionali che prevedono atti chirurgici sempre più minimamente invasivi, è stata sviluppata una varietà di biomateriali eterologhi ed alloplastici di varie forme e dimensioni. (4)

Questi materiali essendo biologicamente inattivi non hanno capacità osteoinduttive e mantengono esclusivamente quelle osteoconduttive, fungendo da scaffold, e facilitando il rimodellamento osseo ad opera del sistema osteoclastico-osteoblastico. (5)

Nell'utilizzo di questi materiali, forniti sotto forma di polveri o blocchi da modellare contestualmente all'atto chirurgico, è possibile ipotizzare l'utilizzo, in clinica, di tecniche sperimentali che effettuano la modellazione dello scaffold sfruttando l'associazione di tecniche di diagnostica tridimensionale TC/ConeBeam per la rilevazione del difetto e la stampa 3D pre operatoria del materiale da innestare. (6)

Proprietà	Descrizione	Classe
Osteoconduzione	Fornisce una struttura rigida su cui può essere formato nuovo osso	Ceramiche, polimeri sintetici, collageno
► Osteogenesi	Processo di formazione di nuovo osso, attuata dagli osteoblasti	Aspirato di osso midollare
<ul> <li>Osteoinduzione</li> </ul>	Induce la trasformazione delle cellule staminali mesenchimali negli elementi delle linee cellulari dell'osso	Matrice di osso liofilizzato, BMP, fattori di crescita
<ul> <li>Tutte (osteogenesi, osteoinduzione, osteoconduzione)</li> </ul>	Promuove una o più delle proprietà precedentemente descritte	Compositi (biomateriali associati tra loro e contenenti, o meno, BMP o fattori di crescita)

Tab.1 Proprietà biologiche degli innesti

# • Biomateriali

Per "biomateriale" si intente qualsiasi materiale, di origine naturale o sintetica, impiantato al fine di ripristinare la morfologia e/o la funzione di tessuti o organi lesi da traumatismi, malformazioni o patologie degenerative. (7)

L'azione dei biomateriali si deve esplicare a partire da una stimolazione biologica e senza un'azione chimica attivatrice, differenziandosi, per questo, dai farmaci.

Muschler e Lane hanno definito un materiale da innesto osseo come: "un qualsiasi materiale impiantato in un sito chirurgico che, da solo o in associazione ad altri materiali, sia in grado di promuovere la rigenerazione ossea tramite le sue proprietà osteoinduttive, osteoconduttive, osteoconduttive, osteogenetiche e di bioattività". (8)

L'insieme delle sue proprietà fisiche, chimiche e biologiche, lo stato di salute dell'organismo e della sede ricevente, e le capacità del chirurgo che esegue l'innesto e ne controlla l'evoluzione del postoperatorio determinano il successo clinico della procedura rigenerativa.

Il biomateriale da rigenerazione ossea verrà sottoposto a stimoli biologici subendo sia un rimaneggiamento chimico da parte dell'organismo sia una modellazione meccanica, dipendenti dalle caratteristiche morfologiche del sito ricevente (compressioni e tensioni muscolari).

La riduzione della stabilità del materiale, associata alle aggressioni chimiche e fisiche, causerà un riassorbimento volumetrico del materiale innestato.

I biomateriali esplicano due funzioni principali: una di supporto meccanico alla guarigione ed una associata alla stimolazione dei meccanismi di guarigione

La prima funzione può essere definita come una vera e propria modulazione della riparazione ossea che segue ad un danno chirurgico. Il biomateriale, integrando il coagulo riduce il rimodellamento volumetrico contribuendo a formare un tessuto vitale che verrà sostituito da osso maturo in tempi variabili e correlati alla natura stessa del biomateriale. L'obiettivo da raggiungere è correlato alla riduzione di perdita volumetrica del settore da riabilitare.

La seconda funzione è correlata alle capacità osteogenetiche proprie dell'innesto, che non si comporta solo da elemento strutturale ma attua anche una induzione della rigenerazione ossea.

L'azione di guida e sostegno meccanico è raggiungibile con tutti i biomateriali, presenta solo variabili temporali sulla maturazione ossea definitiva. (9)

L'azione osteoprogenitrice necessita di proprietà osteogenetiche dirette, come quelle possedute dall'osso autologo, o indirette, per l'aggiunta di BMP o fattori di crescita.

Le caratteristiche morfologiche, chimiche e biologiche di un biomateriale devono essere il più simili possibile alle proprietà del tessuto osseo. Il migliore materiale sarà quindi quello che meglio interagirà con i processi di rimaneggiamento e guarigione ossea (Tab. 2).

Parikh ha proposto una classificazione che suddivide i biomateriali secondo le proprietà che esplicano sull'osso (10)

Osso	umano			
► Os	so autogenico (autologo)			
	Osso umano			
	Osso allogenico omologo	Osso allogenico congelato fresco		
4		Osso allogenico liofilizzato		
$\geq$		Osso allogenico liofilizzato demineralizzato		
∝	Osso animale			
ш	<ul> <li>Osso allogenico eterologo (xenogenico)</li> </ul>	Idrossiapatite di derivazione animale		
F	Sostituti ossei			
4	Ceramiche	Naturali	Carbonato di calcio corallino	
Σ		Sintetiche	Fosfato tricalcico	
0			Idrossiapatite	
_			Vetri bioattivi	
8	► Polimeri			

Tab.2 Tipi di materiali

# Osso autologo

L'osso autologo, rappresenta il gold standard per tutti i biomateriali, esercitando contemporaneamente una funzione osteogenetica, osteoinduttiva e osteoconduttiva (11).

I maggiori svantaggi che l'utilizzo di osso autologo comporta sono legati alla limitata quantità di osso disponibile per il prelievo, dipendente dalle caratteristiche anatomiche dimensionali del sito donatore, e alla necessità di un secondo sito chirurgico nello stesso individuo

• Materiali allogenici/xenogenici

L'osso eterologo o xenogenico è un osso corticale, midollare o proposto sotto forma di un mix di entrambe le componenti proveniente da diverse specie animali, bovini, equini, e suini.

L'osso non può essere utilizzato se non previa de-antigenizzazione, pertanto deve subire processi che fisici e/o chimici per asportarne la componente organica.

I vecchi processi di de-antigenizzazione rendevano questi materiali più simili agli alloplastici che agli allogenici/xenogenici.) tanto da farli diventare simili a composti calciofosfatici di sintesi.

I moderi processi, invece, sfruttano un deantigenizzazione enzimatica che permette in alcuni composti il mantenimento di elementi strutturali dalla moderata proprietà osteoinduttiva, come il collagene. (12)

Il tempo per la sostituzione completa dipende da variabili anatomiche (rapporto tra superficie ossea vitale e volume del sito innestato) nonché da fattori individuali variabili da paziente a paziente. Il tempo di rimodellamento medio è di 4-6 mesi per gli innesti d'osso spongioso e 8-12 mesi per gli innesti d'osso corticale. (13)

L'osso può presentarsi in blocchi o sotto forma di granuli di spongiosa o corticale. Una caratteristica rilevante di questo materiale è l'intrinseca porosità che favorisce sia la stabilità strutturale che la migrazione all'interno della struttura di cellule che consentono la rigenerazione.

I blocchi di osso mostrano un indice di somiglianza all'osso umano utilizzato come standard di riferimento (bone structural similarity score - BoSS), elevato.

Le caratteristiche di porosità, e struttura trabecolare in relazione alla superficie e le caratteristiche meccaniche risultano comparabili a quelle dell'osso umano.

#### • Materiali alloplastici

I materiali alloplastici sono materiali privi di attività osteoinduttiva, riassorbibili o non riassorbibili, biocompatibili, bioinerti, bioattivi con proprietà osteoconduttive.

Possono avere origine naturale o di sintesi, presenza o assenza di riassorbibilità ma comunque mostrano biocompatibilità, bioattività e bioinerzia.

Questi materiali, possedendo esclusivamente capacità osteoconduttiva, agiscono come substrato rigido per la stabilizzazione del coagulo e la successiva invasione cellulare. Tra questi il più utilizzato è il beta fosfato tricalcico ( $\beta$ -TCP). (14)

Il  $\beta$ -TCP è un materiale sintetico biocompatibile, utilizzato come sostitutivo dell'osso umano in campo ortopedico ed odontoiatrico. È indicato in tutti i tipo di intervento quali riempimento di siti postestrattivi, di ricostruzione di difetti ossei e riempimento di cavità. (15)

Questo materiale, composto da fosfato di Ca, è una ceramica bioattiva che mostra capacità di osteoconduzione andando incontro a sostituzione con connettivo denso con successiva mineralizzazione. Il  $\beta$ -TCP ha una granulometria media è compresa tra 500 $\mu$  e 1mm con macropori di diametro compreso tra 100 e 400  $\mu$ m e micropori di diametro inferiore a 10 $\mu$ 

I granuli di  $\beta$ -TCP che sono ancora evidenziabili nella compagine ossea dopo 4 mesi dall'innesto, esercitano un'azione di guida per l'osso in via di formazione. Dopo 6 mesi i granuli non sono più evidenziabili in quanto vanno incontro ad un processo di completo riassorbimento. (16)

#### Progetto di ricerca

La linea di ricerca sviluppata nel Dottorato è stata rivolta allo sviluppo di un sistema integrato per la rigenerazione dei difetti ossei.

Si sono, pertanto, analizzate le potenzialità della progettazione e della creazione di scaffold personalizzati, realizzati anche utilizzando un workflow digitale basato sull'acquisizione dei dati con una metodica radiologica CBCT. L'uso di questa metodica di acquisizione dati permette di rilevare e riprodurre tridimensionalmente il difetto osseo e sfruttando la digitalizzazione dell'acquisizione, rende possibile progettare tridimensionalmente un manufatto riempitivo

La successiva elaborazione di dati utilizza software di modellazione 3D rivolti specificatamente all'impiego in campo medico.

Il progetto, sotto forma di file STL, comunemente modificabile e leggibile da programmi di progettazione e prototipazione industriale, viene inviato ad un fresatore a controllo numerico che si occupa della creazione del manufatto.

Preliminarmente si è, pertanto, proceduto alla valutazione delle possibilità di produzione degli scaffold ossei con metodiche di modellazione sottrattive, mediante l'utilizzo di un fresatore a controllo numerico (CNC) che costituirebbe il supporto morfologico ingegnerizzato dei meccanismi rigenerativi indagati. Sono state pertanto analizzati gli effetti dei vari trattamenti necessari sulla struttura dello scaffold osseo.

# 1. Valutazione sperimentale degli effetti di vari strumenti di taglio sulla morfologia di scaffold di osso eterologo

I sostituti ossei sotto forma di particolato in combinazione con le membrane di collagene sono indicati per un aumento volumetrico osseo ma a causa della loro instabilità meccanica si rende necessaria la presenza di una membrana che oltre ad avere una funzione biologica, stabilizza il particolato nel sito chirurgico. (17,18)

I sostituti ossei sotto forma di blocchi, possono rappresentare un'alternativa ai materiali da innesto granulari poiché garantiscono una struttura rigida per il supporto meccanico. (19)

L'uso di blocchi ossei xenogenici; consente di superare la scarsa stabilità 3D dei sostituti del particolato senza la necessità di una membrana rigida; fornendo buoni risultati a lungo termine mostrando tassi di riassorbimento congrui ad i volumi ossei rigenerati. (20)

I blocchi ossei che vengono forniti in forma cubica o parallelepipeda non corrispondono alla morfologia del difetto da rigenerare risultando nella necessità di modellare i blocchi.

La modellazione può essere eseguita prima o durante l'intervento chirurgico.

Mediante una pianificazione computerizzata basata su una scansione tomografica (CBCT) l'industria può inviare un innesto osseo preformato e sterilizzato. In alternativa; il medico può modellare il blocco osseo intra- o peri-operativamente a mano; o usando una fresatrice a controllo numerico (CNC).

La modellatura manuale può essere eseguita con strumenti rotanti o strumenti vibranti.

Gli strumenti rotanti, montati su dispositivi ad alta o bassa velocità, usano frese, diverse per materiali e forme per eseguire l'osteotomia, gli strumenti vibranti sono divisi in strumenti piezoelettrici e strumenti sonici.

Gli strumenti piezoelettrici sfruttano la deformazione dimensionale dei dischi per far vibrare una punta.

L'osteotomia viene eseguita con una micronizzazione ossea prodotta da onde d'urto meccaniche con una vibrazione lineare compresa tra 24 e 36 kHz e un'ampiezza che varia da 20 a 200 mm. Le caratteristiche principali di questo dispositivo sono rappresentate dal taglio micrometrico; l'attività selettiva sui tessuti mineralizzati e l'influenza positiva del taglio ad ultrasuoni sulla guarigione ossea.(21)

Gli osteotomi sonici azionati dall'aria eseguono l'osteotomia con una vibrazione che varia da 3 a 6 kHz e un'ampiezza che varia da 200 a 300 mm. Le punte soniche ruotano con un movimento di tocco circolare; e sono orientati dall'attrito nella linea dell'osteotomia. (22)

L'azione di taglio che provoca traumi ossei può produrre carbonizzazione e detriti; che può interferire con la risposta di guarigione in tutte le procedure chirurgiche. L'osteotomia in vivo dovrebbe rispettare la morfologia ossea per ottenere i migliori risultati biologici e clinici.

Il sostituto osseo è a diretto contatto con l'osso nativo che dovrebbe essere rigenerato; quindi l'interfaccia ideale tra due dovrebbe imitare l'osso naturale permettendo una colonizzazione cellulare invece di un processo di riassorbimento che rallenterà il processo di guarigione. (23)

Il rispetto della morfologia anatomica ossea è direttamente collegato al comportamento cellulare che riassorbe / assorbe e colonizza il patibolo osseo. (24)

Inoltre, è dimostrato come la presenza di detriti e danni termici possa indurre e aumentare la reazione infiammatoria che può portare ad un aumento del riassorbimento osseo fino a un fallimento dell'innesto.

Tutti i dispositivi di taglio utilizzati nella presente ricerca sono stati utilizzati sotto irrigazione, imitando la reale situazione clinica. L'irrigazione riduce il calore che causa l'osteonecrosi, abbassando la temperatura della superficie di taglio. (25)

Lo scopo della valutazione al SEM è di osservare l'area di contatto fresa / punta-osso per valutare i cambiamenti macro e microstrutturali nella struttura ossea dovuti a traumi chirurgici.

# Materiali e metodi

Quattro blocchi ossei spongiosi equini (10x20x5 mm) con collagene (OX block; Osteoxenon; Bioteck; Italia) sono stati divisi in 15 campioni in una forma cubica (5x4x5 mm). Per ottenere la

forma cubica sono state eseguite quattro osteotomie per campione. È stato utilizzato un singolo dispositivo di taglio per ciascun campione. I seguenti dispositivi per la modellizzazione ossea sono stati utilizzati in questo studio. (Fig.1)



Fig.1 Frese/punte

• Gruppo A: 1 fresa diamantata in acciaio tronco conica (diametro ISO 016) Komet (Komet; Lemgo; Germania)

• Gruppo B: 1 fresa rotonda in carburo di tungsteno Komet (diametro ISO 018) (Komet; Lemgo; Germania)

• Gruppo C: 1 fresa tipo Lindemann in acciaio inossidabile Komet (diametro ISO 016) (Komet; Lemgo; Germania)

• Gruppo D: 1 punta Mectron OT12S montata su Piezosurgery Touch (Mectron; Vicenza Italia)

• Gruppo E: 1 Sonosurgery SFS 101 montato su Sonosurgery (Komet Dental; Lemgo; Germania

Le punte per piezosurgery e sonosurgery sono state usate con movimenti delicati e pochissima pressione.

La fresa diamantata e fresa tipo Lindemann sono state utilizzate su un manipolo ad alta velocità (400000 giri / min) (Bien Air; Dental SA; Bienne; Svizzera)

La fresa al carburo di tungstein rotondo è stata utilizzata su manipolo a bassa velocità (2000-40000 giri / min) (W&H Dentalwerk Burmoos GmbH; Austria)

La parte superiore e inferiore non tagliata del blocco osseo è stata utilizzata come controllo. (Gruppo F)

Sono state eseguite 4 osservazioni SEM per ciascun campione nell'area del test e 2 osservazioni nell'area di controllo.

Un operatore; un chirurgo orale con più di dieci anni di pratica di routine nella chirurgia orale e nell'uso del dispositivo ad ultrasuoni è stato reclutato per la creazione del campione.

Tutte le osteotomie sono state condotte sotto irrigazione con soluzione di cloruro di sodio allo 0,9% raffreddata.

Ogni dispositivo e fresa / punta è stato utilizzato secondo le impostazioni consigliate dal costruttore al fine di ottenere tagli su blocchi ossei con le seguenti caratteristiche:

• Variazione percentuale minima tra lo spessore della linea osteotomica e lo spessore della punta

• Superficie ossea osteotomizzata il più liscia possibile

• Integrità della microarchitettura; limitare la presenza di detriti ossei ed evitare lesioni termiche all'osso

• Tempo di taglio il più breve possibile

I campioni sono stati divisi in gruppi da 3 campioni per ogni punta di fresa utilizzata.

I 15 campioni sono stati sottoposti all'osservazione SEM (Phenom Pro 5; Phenom-World

B.V .; Eindhoven; Paesi Bassi) per osservare direttamente la struttura macroscopica e microscopica.

La superficie dei campioni è stata analizzata con una risoluzione di  $3072 \times 2304$  pixel con un ingrandimento di  $500x \pm 50x$ . [36]

All'interno della stessa area del campione; le osservazioni sono state condotte prendendo riferimenti casuali da tre aree predefinite che erano 500 µm2.

Due osservatori addestrati hanno analizzato indipendentemente le immagini su uno schermo da 24 pollici ad alta definizione. Ogni superficie di taglio di ciascun campione è stata osservata in modo casuale in tre aree.

I parametri osservativi sono stati registrati seguendo lo schema proposto da Romeo et al.:

- Precisione di taglio (precisione)
- Profondità dell'incisione (profondità)
- Danni termici periferici (carbonizzazione)
- Presenza di detriti ossei (frammenti ossei)

Ad ogni parametro è stato attribuito un punteggio da 0 (voto molto basso), 1 (voto basso), 2 (voto moderato) a 3 (voto alto). I dati numerici sono espressi come media e deviazione standard (S.D.) e la variabile categoriale "gruppo" come numero e percentuale.

Ogni punteggio di parametro è stato valutato numericamente seguendo lo schema proposto nella tabella 3

Parametri osservazionali	Score 0	Score 1	Score 2	Score 3
Precisione	Impossibile	Bassa preservazione	Moderata preservazione	Alta preservazione di
	identificare strutture	di strutture	di strutture anatomiche	strutture anatomiche
	anatomiche	anatomiche		
Profondità	Profondità di taglio	Profondità di taglio	Profondità di taglio	Profondità di taglio
	molto bassa	bassa	moderata	alta
Carbonizzazio	Assenza di	Bassa presenza di	Moderata presenza di	Alta presenza di
ne	carbonizzazione	carbonizzazione	carbonizzazione	carbonizzazione
Frammenti	Assenza di detriti	Bassa presenza di di	Moderata presenza di	Alta presenza di
ossei	ossei	detriti ossei	detriti ossei	detriti ossei

# Tab.3 Punteggi

Per i parametri nitidezza; profondità; carbonizzazione e detriti ossei, abbiamo confrontato tutti e sei i gruppi usando il test Kruskall Wallis; dato che è risultato altamente significativo, abbiamo eseguito confronti a coppie tra i gruppi usando il test di Mann Whitney. Per questi confronti multipli; abbiamo dovuto applicare la correzione di Bonferroni; per cui il significato alfa livello 0,050 deve essere diviso per il numero dei possibili quindici confronti a coppie;

Le analisi statistiche sono state eseguite utilizzando SPSS 17.0 per il pacchetto Windows.

P <0; 05 due parti sono state considerate statisticamente significative.

# Risultati

Analisi quantitativa

I parametri osservazionali per ciascun gruppo sono espressi nella tabella 4

e Profondità (0-3) 8 0.79 ± 0.4	Carbonizatione (0-3)	Detriti(0-3)
$(0-3) \\ 8 \qquad 0.79 \pm 0.4$	(0-3)	
$8  0.79 \pm 0.4$		
	$0.33 \pm 0.4$	$1.79 \pm 0.8$
$3 2.50 \pm 0.8$	$1.40 \pm 0.5$	$3.00 \pm 0$
5 $1.96 \pm 0.4$	$0.62 \pm 0.6$	$2.15\pm0.5$
$6  1.00 \pm 0.9$	$0.38 \pm 0.5$	$1.31 \pm 0.6$
5 $1.50 \pm 0.5$	$1.00 \pm 0.6$	$1.56 \pm 0.5$
$8  0.58 \pm 0.5$	$0.17 \pm 0.4$	$0.75 \pm 0.4$
	$\begin{array}{c} 3 \\ 5 \\ 6 \\ 5 \\ 5 \\ 1.96 \pm 0.4 \\ 6 \\ 1.00 \pm 0.9 \\ 5 \\ 1.50 \pm 0.5 \\ 8 \\ 0.58 \pm 0.5 \end{array}$	3 $2.50 \pm 0.8$ $1.40 \pm 0.5$ 5 $1.96 \pm 0.4$ $0.62 \pm 0.6$ 6 $1.00 \pm 0.9$ $0.38 \pm 0.5$ 5 $1.50 \pm 0.5$ $1.00 \pm 0.6$ 8 $0.58 \pm 0.5$ $0.17 \pm 0.4$

Tab.4 Parametri osservazionali (valori medi e Std.dev)

Il test di Kruskall Wallis ha mostrato valori altamente significativi (P<0;05) per tutti i parametri osservazionali registrati tra i gruppi

Il test di Mann Whitney con la correzione di Bonferroni ha mostrato livelli di significatività di 0.050 / 15 = 0.003.

# Analisi qualitativa

# Frese in acciaio

Il gruppo fresa diamantata mostra un moderato rispetto della morfologia ossea. La superficie di taglio presenta una superficie di taglio moderatamente irregolare con bassa profondità di taglio, molti detriti e bassi segni di carbonizzazione. Erano evidenti segni di lacerazioni della struttura trabecolare. (Fig.2)



Figura 2. Superficie di un campione tagliato con fresa diamantata. (D. detriti, L. lacerazione)

# Fresa a palla in carburo di tungsteno

La fresa a palla in carburo di tungsteno mostra una morfologia ossea sovvertita. La superficie di taglio mostra una precisione molto bassa e un'alta profondità di taglio. Sono presenti molti detriti ma ci sono bassi segni di carbonizzazione. (Fig.3)





# Fresa tipo Lindemann in acciaio

La fresa tipo Lindemann mostra una superficie con un basso rispetto della morfologia originale. L'area di taglio appare irregolare in profondità e forma insieme a molti detriti e segni di carbonizzazione. Sono inoltre visibili microcracks ed esfoliazioni di strati ossei (Fig.4)



Figura 4. Superficie del campione fresa tipo Lindemann in acciaio (D. detriti, C. carbonizatione M. microcracks ed esfoliazione)

Piezosurgery OT12S

Il gruppo di taglio piezoelettrico con punta OT12S mostra una superficie tagliata con alto rispetto della morfologia ossea originale. L'area di taglio mostra una bassa presenza di detriti; bassa profondità di taglio; forma moderatamente irregolare e bassa presenza di carbonizzazione ossea. (Fig.5)



Figura 5. Superficie del campione della punta piezo-chirurgica OT12S (C. carbonizzazione, D. detriti)

# Sonosurgery SFS 101

Il gruppo di taglio sonico con punta SFS 101 mostra una superficie con un moderato rispetto dell'anatomia. La superficie di taglio presenta una precisione e profondità di taglio moderate; con detriti e molti segni di carbonizzazione. La superficie ossea sembra essere liscia e regolare con pochi segni di esfoliazioni di strati ossei (Fig.6)



Figura 6. Superficie campione punta Sonosurgery SFS 101 (D. detriti, C. carbonizzazione)

# Campione di controllo

Il gruppo di controllo mostra una struttura ossea ben rappresentata, con cavità di forma sferica o ovoidale delimitate da una densa trabecolazione. Sulla superficie è possibile vedere fibre di collagene collassate e detriti limitati. (Fig.7)



Figure 7. Superficie gruppo controllo

# **Discussione e Conclusioni**

Il modello di blocco osseo utilizzato è paragonabile alla morfologia ossea umana, quindi l'effetto della fresa / punta potrebbe essere comparabile e la risposta cellulare risultante potrebbe essere collegata e prevista con la migliore superficie di taglio che dovrebbe essere simile alla morfologia del non tagliato ossea. (26)

Nel valutare le migliori prestazioni della punta di taglio, si devono tenere in considerazione i parametri come un'alta precisione del taglio, che consente di seguire una linea precisa sull'osteotomia ed una bassa profondità di incisione che rappresenta la tridimensionalità del danno indotto nell'osso zone vicine,

La presenza di detriti dovrebbe anche essere minimizzata per non indurre un processo di riassorbimento da parte della linea cellulare osteoclastica insieme al segno di carbonizzazione che può indurre un aumento della risposta infiammatoria.(27)

La nostra analisi SEM mostra come si ottenga il miglior risultato effettuando un osteotomia eseguita con la punta piezo-chirurgica OT12S. L'anatomia tridimensionale trabecolare e lacunare è meglio rispettata rispetto al gruppo di controllo. La superficie del taglio mostrava un taglio netto con meno segni di lacerazioni e meno presenza di detriti ossei insieme a pochi segni di carbonizzazione.

Dal confronto tra i campioni del gruppo 4 ai campioni del gruppo di controllo, sembra evidente come l'area di taglio mostri una bassa presenza di detriti, una forma moderatamente irregolare che è evidente in tutti i campioni ma è collegata all'azione modellante stessa e bassa presenza di carbonizzazione ossea che potrebbe essere collegata all'azione della soluzione di irrigazione e al movimento piezoelettrico.

La presenza limitata di detriti può essere collegata all'effetto di cavitazione del movimento piezoelettrico che sembra rimuovere meglio i detriti presenti. I risultati della sono schirurgia sono promettenti, ma la profondità dell'incisione e l'elevata presenza di carbonizzazione possono limitarne l'uso. Un'altra limitazione principale è rappresentata dalla soluzione di raffreddamento e dalla sua sterilità. Il dispositivo sonico utilizza acqua potabile non sterile che essendo una soluzione ipotonica non sterile non favorisce l'omeostasi cellulare e può produrre contaminazione dell'area chirurgica. (27)

Il miglior risultato nel gruppo dei dispositivi rotanti si trova quando si utilizza la fresa diamantata in acciaio inossidabile che mostra tuttavia risultati non confrontabili con il gruppo vibrante. Il risultato peggiore viene mostrato quando si utilizza la fresa rotonda in metallo duro a bassa velocità che sovverte la morfologia anatomica e non è suggerita dal presente studio.

L'analisi statistica conferma l'alto significato statistico (P <0,05) per tutti i parametri osservativi registrati in tutti i gruppi. Il test di Mann Whitney con la correzione di Bonferroni conferma la pertinenza dei dati.

# 2. Valutazione sperimentale degli effetti della sterilizzazione in autoclave su blocchi di osso equino collagenato

La modellazione dei blocchi di osso si rende necessaria quando, durante le procedure rigenerative, la forma del blocco venduto dal commercio non è assimilabile a quella del difetto da rigenerare. La sagomatura potrebbe essere eseguita dall'industria che, secondo una CBCT fornito dal medico, può inviare al clinico un blocco personalizzato e sterilizzato. In alternativa il clinico può modellare "in casa" prima o durante l'intervento chirurgico. La modellazione fatta a mano ha, tuttavia, una mancanza di precisione relativa al metodo di modellatura. Per ovviare a questo problema è possibile utilizzare un fresatore a controllo numerico (CNC). Questa macchina ha una precisione micrometrica, tuttavia, a causa delle sue caratteristiche, le sterilità non raggiunge livelli soddisfacenti utilizzando altre tecniche (28).

Lo scopo della nostra ricerca era di valutare se diversi protocolli di sterilizzazione in autoclave possono modificare la struttura ossea macroscopica e microscopica di un blocco di osso equino collagenato e se questi protocolli influenzeranno la matrice del collagene.

### Materiali e Metodi

Due blocchi di osso equino collagenato ( 10x20x5 mm ( OX Block, Osteoxenon, Bioteck, Italia ) sono stati divisi in 16 campioni di forma cubica (5x5x5 mm) utilizzando una fresa tipo Lindemann in acciaio ( Komet, Komet It Srl, Italia ).

• Test di sterilizzazione

Un campione è stato usato come controllo e non sottoposto a nessun trattamento.

15 campioni sono stati infettati con una coltura batterica.

Lo Streptococcus faecalis , utilizzato per il test di sterilizzazione , era stato precedentemente isolato da un tampone faringeo e incubato, in condizioni standardizzate, per 24 ore in brodo di thioglycollato sterile a  $37 \pm 2$  C.

I valori di pH del brodo sono stati misurati all'inizio e alla fine di ciascun ciclo di incubazione. 1 ml di thioglycollato conteneva 1 x 105 CFU / ml di colonie di Streptococcus faecalis.

Ciascun campione è stato contaminato utilizzando micropipette sterili con 0,5ml di thioglycollato.

I 15 campioni sono stati divisi casualmente in 3 gruppi e sottoposti alla sterilizzazione in autoclave con lo stesso dispositivo (Euronda E9 Med, Euronda, Italia).

Il gruppo A è stato sottoposto a un ciclo di sterilizzazione a 121 ° C, 1,16 bar per 20 minuti. e 15 min. di essiccazione

Il gruppo B è stato sottoposto a un ciclo di sterilizzazione a 134  $^{\circ}$  C a 2,16 bar per 4 minuti. di sterilizzazione. e 15 min. di essiccazione

Il gruppo C è stato sottoposto a un ciclo di sterilizzazione a 134 ° C a 2,16 bar per 3,30 min. di sterilizzazione e 5 min. di essiccazione

Due campioni per ciascun gruppo sono stati valutati per la oggettivarne la sterilità

1 campione per gruppo è stato incubato in condizioni standardizzate per 24 ore in brodo di tioglicollato a  $37 \pm 2$  ° C;

1 campione per gruppo è stato incubato in condizioni standardizzate per 24 ore in soluzione salina normale a 37  $\pm$  2 ° C;

Per valutare gli effetti di sterilizzazione, 18  $\mu$ l di tioglicollato e 18  $\mu$ l di soluzione salina normale sono stati raccolti e incubati per 24 ore a 37 ± 2 ° C in agar CLED e agar ESCULINA, per la conta batterica.

Dopo 24 ore di incubazione, la presenza batterica è stata valutata mediante un test biochimico convenzionale e le colonie sono state contate e interpretate come unità formanti colonie

# • Valutazione strutturale

Dopo la sterilizzazione a vapore in autoclave, il 9 campioni s che non sono stati valutati per la sterilità e sottoposto ad osservazione al microscopio elettronico a scansione (S. E. M.) (Phenom Pro 5, Phenom-World BV ., Eindhoven , Olanda ) per l'osservazione della struttura la macroscopica e microscopica.

Tre aree casuali di ciascuna superficie sono state osservate con lo stesso ingrandimento e sono stati registrati i cambiamenti microstrutturali .

Dopo l'osservazione S.E.M., 12 campioni sono stati sottoposti all'osservazione al microscopio confocale laser (Zeiss LSM 510, Carl Zeiss S.p.A., MI, Italy) per valutare la presenza di collagene. È stata osservata la superficie non tagliata e non fratturata.

### • Protocollo di microscopia elettronica a scansione

Dopo la fissazione con glutaraldeide al 2%, gli campioni sono stati disidratati in etanolo e amil-acetato. Quindi, sono stati essiccati con un essiccatore a punto critico Balzers usando CO2 liquida. Le superfici ossee sono state montate su supporto e rivestite con platino mediante un sistema di sputtering " Plasma Sciences CrC-100 Turbo Pumped " ed osservate dal microscopio elettronico a scansione Phenom G2 pro

• Protocollo microscopio confocale laser

Dopo fissazione in glutaraldeide al 2% e risciacquo in tampone fosfato 0,13 mol / L, pH 7,3, i campioni sono stati decalcificati in acido etilendiamminotetraacetico al 4,13% , pH 7,2, disidratati in etanolo e incorporati in paraffina. Sezionati per ottenere sezioni da 8 micrometri di spessore, utilizzando il Microtomo Leica (Leica RM2255, Leica, Leica Biosystems, MI, Italia).

Le sezioni sono state trattate con i seguenti anticorpi: anti-collagene I monoclonale (diluito 1: 1000; Sigma-Aldrich) che sono stati resi evidenti con o IgG-Texas Red (diluizione 1: 100; Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, USA). [49-50]

I controlli negativi sono stati effettuati trattando le sezioni solo con l'anticorpo secondario. I campioni sono stati osservati con il microscopio confocale Zeiss LSM 510. (Zeiss LSM 510, Carl

Zeiss SpA, MI, Italia) La funzione "Display profile" del microscopio a confolale laser è stata utilizzata per mostrare il profilo di intensità attraverso un'immagine lungo una linea liberamente selezionabile.

# Risultati

• Test di sterilizzazione

La sterilità è stata raggiunta in tutti i campioni, considerando un SAL (livello di garanzia di sterilità) di  $10^{-6}$ 

• Valutazione al microscopio elettronico a scansione (SEM)

Gruppo A: le immagini mostrano un'architettura ossea definita con cavità di forma sferica delimitate da una densa trabecolazione. (42x) (F ig.8)



Fig.8 Gruppo A: cavità di forma sferica ed ovoidale (42x).

È possibile osservare in dettaglio una trabecola, che delimita due cavità, ed è possibile vedere la presenza di alcuni residui di diverse forme e dimensioni. La morfologia ossea sembra essere ben conservata. (1100x) (F ig.9)



Fig. 9 Gruppo A: una trabecola intatta con alcuni residui

Gruppo B, Gruppo C: le immagini mostrano cavità di forma ovoidale e sferica delimitata da una densa trabecolazione (40x) (Fig. 10,12).



Fig. 10 Gruppo B: cavità comunicanti morfologicamente ben conservate di forma ovoidale e sferica delimitate da una densa trabecolazione (40x).



Fig. 12 Gruppo C: cavità comunicanti morfologicamente ben conservate di forma ovoidale e sferica delimitate da una densa trabecolazione (40x).

Aumentando l'ingrandimento, è possibile osservare una trabecola con cavità comunicanti più piccole, la superficie della trabecola sembra essere ben conservata. (2500x) (Fig.11, 13)



Fig.11 Gruppo B: una trabecola con residui. (2500x)



Fig.13 Gruppo C: una trabecola ben conservata con piccole cavità comunicanti; la superficie della trabecola sembra essere ben conservata (420x).

• Valutazione al microscopio confocale

Gruppo A: l'immagine mostra che il collagene di tipo 1 del campione presenta uno schema di fluorescenza che si evidenzia con continuità alla periferia della trabecola. (Fig.14)



Fig. 14 Gruppo A: un pattern di fluorescenza fluorescente continuo di collagene di tipo 1.

Gruppo B: l'immagine mostra che il collagene di tipo 1 del campione presenta uno schema di fluorescenza evidente alla periferia della trabecola a volte continuo e intenso, a volte debole e diffuso. Una debole fluorescenza è osservata ai bordi. Questo gruppo sembra essere simile al gruppo A. (Fig.15)



Fig.15 Gruppo B: il modello di fluorescenza del collagene di tipo 1

Gruppo C: le immagini mostrano che il collagene di tipo 1 del campione presenta uno schema di fluorescenza che si trova alla periferia della trabecola in modo continuo e uniforme. L'intera trabecola presenta un debole pattern di fluorescenza diffusa con un decorso circonferenziale, a volte più marcato attorno alle lacune. (Fig.16)



Fig.16 Gruppo C: il pattern di fluorescenza del collagene di tipo 1

La funziona display profile mostra l'intensità della fluorescenza lungo una linea selezionata.

L'intensità del segnale fluorescente appare più pronunciata e uniforme nel gruppo C rispetto al gruppo A e B. Comparando il gruppo A e il gruppo B è evidente una maggiore intensità del segnale nel gruppo A (F ig.17)



Fig.17 Analisi con funzione display profile

# **Discussione e Conclusione**

Il nostro lavoro mostra come sia possibile ottenere una sterilità soddisfacente dell'innesto, utilizzando un dispositivo tradizionale come l'autoclave.

L'analisi microbiologica mostra come, in accordo con la letteratura, la sterilità è stata raggiunta in tutti i campioni.

La nostra ricerca mirava anche a capire se questa procedura potesse modificare la morfologia ossea e il collagene.

L'osservazione ad occhio nudo mostra un campione leggermente disidratata rispetto al campione di controllo.

L'osservazione S.E.M. tra il campione di controllo ed i campioni dei tre gruppi, evidenzia come, a diversi ingrandimenti, la macrostruttura non subisce modifiche sostanziali.

In tutti i campioni, la struttura ossea sembra essere ben conservata e la morfologia sembra essere molto simile. È evidente come l'alta temperatura non abbia determinato modifiche evidenti e significativi della struttura del campione.

La matrice di collagene che è un caratterista particolare dell'innesto osseo equino, che viene preservata a causa dell'impossibilità di questa specie di essere infettata da prioni, sembra essere variamente mantenuta.

L' analisi di immunofluorescenza al microscopio confocale mostra come il gruppo C (131 veloce) abbia la struttura di collagene meglio conservata. Questa osservazione è confermata anche dall'analisi display profile, che valutando l'intensità della fluorescenza sottolinea come il segnale fluorescente appaia più uniforme e intenso rispetto agli altri gruppi. Quando si confrontano i gruppi A e B, il primo mostra e una fluorescenza più forte ed uniforme.

Le temperature, raggiunte nella sterilizzazione in autoclave a vapore, sembrano essere rispettose delle fibre di collagene che rimangono sempre al di sotto della temperatura di transizione termica (29).

La resistenza al collagene ai danni da calore e pressione, quindi, sembra essere correlata al tempo. Quando viene eseguita una sterilizzazione in autoclave il protocollo suggerito è a 134° C e 2,16 bar per 3,30 min. e 5 min. di asciugatura.

Dall'analisi dei nostri dati, il metodo di sterilizzazione a vapore in autoclave può essere un modo affidabile per ottenere la sterilizzazione dell'innesto osseo.

Dare la possibilità di utilizzare una fresatrice CNC non sterile aprirà un nuovo scenario di precisione nell'innesto osseo, consentendo al chirurgo di ottenere un innesto perfettamente sterilizzato prima dell'intervento.

# **3.** Valutazione preliminare della modellazione di scaffold di osso equino collagenato con fresatori cnc.

Una corretta architettura anatomica dell'innesto tridimensionalmente coerente con il substrato osseo leso è un requisito importante per la corretta osteointegrazione e facilita il rimaneggiamento e la ripopolazione cellulare ad opera degli elementi cellulari deputati.

Il mancato rispetto della macro e micro struttura dello scaffold durante la fase di fresatura, determina che la parte a diretto contatto con l'osso dell'innesto verrà interpretata dagli elementi cellulari come una struttura danneggiata e non verrà colonizzata, bensì completamente riassorbita, allungando i tempi della funzionalizzazione dell'innesto o pregiudicandola.

La modellazione del blocco di osso dal pieno (tecnica sottrattiva) mediante fresatore a controllo numerico, deve essere effettuata mediante l'utilizzo strumenti di taglio che non modifichino la macro e micro struttura dello scaffold.

Una prova di fattibilità della tecnica di produzione di scaffold personalizzati, prodotti mediante tecnica sottrattiva con fresatore a controllo numerico è stata effettuata sagomando uno scaffold e valutandone, mediante microscopia ottica, la coerenza tridimensionale con un modello trasparente del difetto stampato con tecnica stereolitografica.

### Materiali e metodi

Il protocollo di workflow digitale utilizzato prevede una scansione CBCT che permetta di visualizzare tridimensionalmente il difetto osseo da rigenerare.

La risoluzione della scansione, la precisione micrometrica e la qualità del post processing, permettono di avere un file di output privo di deformazioni. Si è pertanto effettuata una CBCT (MyRay, Hyperion X9) di un difetto osseo in una mandibola con i seguenti settaggi: Fov 11 x 8 cm, Voxel  $\leq$ 75 µm.

Il software di scansione prevedendo una funzione per l'esportazione della ricostruzione in formato S.T.L. permette la lettura da parte di software di modellazione 3D in commercio.

Per la progettazione del blocco di osseo (CAD) è stato utilizzando un software (Meshmixer, Autodesk, Inc) che permette di modellare la macromorfologia del blocco e prevedere dei fori per il fissaggio del blocco in sito con delle miniviti.

Il file generato così prodotto è stato inviato al modulo CAM costituito da un fresatore a controllo numerico a 5 assi (Roland DWX-51D).

Il blocco di osso utilizzato per questo proof of concept era di dimensioni di 15x30x5 mm e è stato essere fissato con dei supporti customizzati all'interno del fresatore.

Il tempo di modellazione è direttamente dipendente dall'esperienza dell'operatore. Il tempo di fresaggio è invece dipendente dalla complessità del pezzo da produrre.

La prova di fattibilità ha previsto inoltre la stampa in resina di un modello sterolitografico del segmento osseo da rigenerare, realizzato con una stampante 3d Low Force Stereolithography (LFS) (Formlab, Form3) (25µm Risoluzione XY, 25 – 300µm Spessore dello strato).

L'utilizzo della resina fotoreattiva metacrilica (Clear, Formlab) ha permesso di ottenere un modello trasparente, su cui valutare la precisione di accoppiamento del blocco prodotto. (Fig.11)

La precisione dell'accoppiamento tra modello e blocco osseo prodotto è stata effettuata con una valutazione del gap effettuata su microfotografie ad ingrandimento 2,3x, 7x e 14x realizzate con una fotocamera Full HD montata su un microscopio ottico (OPMI PROergo, ZEISS). (Fig.12)



Fig.11 Modelli realizzati in resina trasparente



Fig.12 Valutazione della coerenza

# Risultati

I risultati preliminari, realizzati su un numero limitato di campioni (2) dimostrano una buona coerenza tra modello e scaffold modellato con un gap valutato ai margini dell'innesto pari a 1 mm  $\pm$  02.

Attualmente non è ancora possibile trarre conclusioni statistiche attendibili dovendosi aumentare la quantità dei campioni per effettuare una valutazione statistica. Appare inoltre indispensabile valutare e quantificare la coerenza delle superfici interne con un metodo più standardizzabile.

# Discussione e Conclusioni

La valutazione della fattibilità di un work flow completamente digitale nella gestione della forma degli scaffold utilizzabili nella terapia di difetti ossei appare una possibilità concreta.

La valutazione preliminare dei risultati appare coerente con gli obiettivi prefissati in considerazione che un gap marginale prossimo ad 1 mm consente la colonizzazione cellulare come dimostrato da Botticelli et al. (30)

Lo sviluppo delle ricerche condotte nell'ambito del dottorato, potrebbero condurre ad un nuovo approccio medico-chirurgico mediante un un workflow digitale-analogico-digitale che potrebbe prevedere i seguenti step operativi:

• rilevazione del difetto in sede preoperatoria, mediante l'utilizzo delle metodiche di radiologia digitalizzata,

• stampa del modello operatorio in materiale plastico mediante l'utilizzo di stampante 3D, che permetta la visualizzazione e pianificazione su modello del intervento,

• scansione del modello su cui in chirurgo ha effettuato "virtualmente" l'intervento

• elaborazione dei dati rilevati e manipolazione mediante software di modellazione 3D

• produzione dello scaffold osseo in beta fosfato tricalcico con macro e microstruttura ingegnerizzata e proprietà fisiche compatibili con il segmento osseo che deve essere posizionato in sede intraoperatoria.

Un workflow totalmente digitale inoltre permette la rilevazione del difetto in fase preoperatoria, mediante l'utilizzo delle comuni metodiche di radiologia digitalizzata, la pianificazione preoperatoria mediante riproduzione su modelli 3D computerizzati e la produzione del segmento osseo da ricreare mediante tecniche sottrattive su osso eterologo deproteinizzato.

L'utilizzo di una stampante 3D che crea uno scaffold di beta fosfato tricalcico con macro e microstruttura ingegnerizzata e proprietà fisiche compatibili con il segmento osseo che deve essere posizionato in sede intraoperatoria potrebbe essere una valida alternativa alla metodica analizzata.

### 4. Impact e implicazioni traslazionale complessive delle ricerche condotte

La medicina rigenerativa è oggi uno tra i campi più interessante della biotecnologia, in grado di combinare diversi aspetti della medicina, biologia cellulare e molecolare, biomateriali e l'ingegneria dei tessuti, finalizzata a rigenerare, riparare o sostituire tessuti.

La linea di ricerca proposta, sulla base di studi che analizzano vari aspetti della rigenerazione ossea in campo medico è rivolta al miglioramento delle tecniche già utilizzate in questo ambito e si propone di realizzare un sistema integrato standardizzato.

La creazione di un sistema standardizzato permetterebbe un notevole miglioramento della qualità delle terapie medico-chirurgiche riferite alla necessità di rigenerazione ossea.

Lo sviluppo di un workflow digitale permetterebbe di abbattere i costi della pianificazione e produzione dell'innesto e ridurrebbe il costo biologico per il paziente, a cui verrebbe impiantata una protesi biologica in grado di guidare la rigenerazione di osso naturale, in netta antitesi alle protesi in titanio attualmente utilizzate.

Nell'area medica la modellazione personalizzata dei segmenti ossei prodotta in fase preoperatoria, può rappresentare il futuro per la risoluzione delle patologie che determinano difetti ossei.

Nel settore odontoiatrico, in particolare, oltre alle applicazioni nell'ambito squisitamente chirurgico, la rigenerazione ossea è spesso fondamentale per il corretto posizionamento degli impianti dentali.

Pertanto, queste metodiche possono trovare anche positivi riscontri nello sviluppo di applicazioni o brevetti commerciali

Queste metodiche, se comprovate dalla sperimentazione su animali e clinica, appaiono immediatamente esportabili nella pratica clinica sia medico-chirurgica che odontoiatrica con un notevole impatto in tutti i settori in cui la rigenerazione tissutale, epitelio-connettivale, è richiesta.

# Bibliografia

- Baj A, Trapella G, Lauritano D, Candotto V, Mancini GE, Giannì AB. An overview on bone reconstruction of atrophic maxilla: success parameters and critical issues J Biol Regul Homeost Agents. 2016 Apr-Jun;30(2 Suppl 1):209-15.
- 2. Kim RW, Kim JH, Moon SY. Effect of hydroxyapatite on critical-sized defect. Maxillofac Plast Reconstr Surg. 2016 Jul 5;38(1):26. eCollection 2016.
- Muhammad JK, Akhtar S, Abu Al Nassar H, Al Khoury N. Regeneration of a Compromized Masticatory Unit in a Large Mandibular Defect Caused by a Huge Solitary Bone Cyst: A Case Report and Review of the Regenerative Literature. J Maxillofac Oral Surg. 2016 Jul;15(Suppl 2):295-305. Epub 2015 Aug 21.
- Scarano A, Lorusso F, Ravera L, Mortellaro C, Piattelli A. Bone Regeneration in Iliac Crestal Defects: An Experimental Study on Sheep. Biomed Res Int. 2016;2016:4086870. doi: 10.1155/2016/4086870. Epub 2016 May 30.
- Martinez A, Balboa O, Gasamans I, Otero-Cepeda XL, Guitian F. Deproteinated bovine bone vs. beta-tricalcium phosphate as bone graft substitutes: histomorphometric longitudinal study in the rabbit cranial vault. J Clin Oral Implants Res. 2015 Jun;26(6):623-32. Epub 2014 Feb 20.
- 6. Bose S, Tarafder S, Bandyopadhyay A. Effect of Chemistry on Osteogenesis and Angiogenesis Towards Bone Tissue Engineering Using 3D Printed Scaffolds. Ann Biomed Eng. 2016 Jun 10. [Epub ahead of print]
- 7. Muster D. Biomatériaux en chirurgie osseuse et dentaire. Encycl Méd Chir, Stomatologie I, 1987; 2-32
- 8. Muschler GF, Lane JM. Spine fusion: principles of bone fusion. In: Herkovitz HN, Garfin SR, Balderston RA et al. Rothman-Simeone, the spine. 4th ed. Philadelphia: WB Saunders 1999, 1573-89.
- 9. Silva FM, Cortez AL, Moreira RW et al. Complications of intraoral donor site for bone grafting prior to implant placement. Implant Dent 2006; 4:420-6
- Parikh SN. Bone graft substitutes in modern orthopedics. Orthopedics 2002;25(11):1301-9.
- 11. Orsini G, Bianchi AE, Vinci R et al. Histologic evaluation of autogenous calvarial bone in maxillary onlay bone grafts: a report of 2 cases. Int J Oral Maxillofac Implants 2003;18(4):594-8.
- Artese, L.; Piattelli, A.; Di Stefano, D.A.; Piccirilli, M.; Pagnutti, S.; D'Alimonte, E.; Perrotti, V. Sinus lift with autologous bone alone or in addition to equine bone: An immunohistochemical study in man. Implant Dent. 2011, 20, 383–388.
- Di Stefano, D.A.; 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, 11, 90–100
- 14. Piattelli A. Biomateriali utilizzati in rigenerazione ossea: risultati istologici. Implantologia Orale 2003;4:77-80.
- 15. Piccinini M, Prosperi S, Preve E, Rebaudi A, Bucciotti F. In Vitro Biocompatibility Assessment and In Vivo Behavior of a New Osteoconductive βTCP Bone Substitute. Implant Dent. 2016 Aug;25(4):456-63.
- 16. Chiba S, Anada T, Suzuki K, Saito K, Shiwaku Y, Miyatake N, Baba K, Imaizumi H, Hosaka M, Itoi E, Suzuki O. Effect of resorption rate and osteoconductivity of

biodegradable calcium phosphate materials on the acquisition of natural bone strength in the repaired bone. J Biomed Mater Res A. 2016 Jul 8. [Epub ahead of print]

- 17. Strietzel, F.P.; Khongkhunthian, P.; Khattiya, R.; Patchanee, P.; Reichart, P.A. Healing pattern of bone defects covered by different membrane types A histologic study in the porcine mandible. J Biomed Mater Res Part B Appl Biomater 2006;78(1):35-46.
- 18. Schwarz, F.; Herten, M.; Ferrari, D.; Wieland, M.; Schmitz, L.; Engelhardt, E.; Becker, J. Guided bone regeneration at dehiscence-type defects using biphasic hydroxyapatite + beta tricalcium phosphate (Bone Ceramic®) or a collagen-coated natural bone mineral (BioOss Collagen®): an immunohistochemical study in dogs. Int J Oral Maxillofac Surg 2007;36(12):1198-1206.
- Lew, D.; Marino, A.A.; Startzell, J.M.; Keller, J.C. A comparative study of osseointegration of titanium implants in corticocancellous block and corticocancellous chip grafts in canine ilium. J Oral Maxillofac Surg. 1994;52:952–958.
- 20. Cordaro, L.; Amadè, D.S.; Cordaro, M. Clinical results of alveolar ridge augmentation with mandibular block bone grafts in partially edentulous patients prior to implant placement. Clin Oral Implants Res 2002;13(1):103-111.
- Barone, A.; Marconcini, S.; Giacomelli, L.; Rispoli, L.; Calvo, J.L.; Covani, U. A randomized clinical evaluation of ultrasound bone surgery versus traditional. J Oral Maxillofac Surg. 2010;68:330-6. doi: 10.1016/j.joms.2009.03.053. Epub 2010 Jan 15.
- Ferri, M.; Lang, N.P.; Angarita Alfonso, E.E.; Bedoya Quintero, I.D.; Burgos, E.M.; Botticelli, D. Use of sonic instruments for implant biopsy retrieval. Clin Oral Implants Res 2015;26(11):1237-1243.
- 23. Rundle, C.H.; Wang, H.; Yu, H.; Chadwick, R.B.; Davis, E.I.; Wergedal, J.E.; Lau, K.H.; Mohan, S.; Ryaby. J.T.; Baylink, D.J. Microarray analysis of gene expression during the inflammation and endochondral bone formation stages of rat femur fracture repair. Bone 2006;38(4):521-9.
- Romeo, U.; del Vecchio, A.; Palaia, G.; Tenore, G.; Visca, P.; Maggiore, C. Bone damage induced by different cutting instruments - An in vitro study. Braz Dent J 2009;20(2):162-168.
- 25. Di Mauro, D.; Gaeta, R.; Arco, A.; Milardi, D.; Lentini, S.; Runci, M.; Rizzo, G.; Magaudda, L. Distribution of costameric proteins in normal human ventricular and atrial cardiac muscle. Folia Histochem Cytobiol 2009;47(4):605-8.
- 26. Bitar, D.; Parvizi, J. Biological response to prosthetic debris. World J Orthop 2015;6(2):172-189.
- 27. Simonetti, M.; Facco, G.; Barberis, F.; Signorini, G.; Capurro, M.; Rebaudi, A.; Sammartino, G. Bone characteristics following osteotomy surgery: an in vitro SEM study comparing traditional Lindemann drill with sonic and ultrasonic instruments. POSEIDO. 2013;1(3):187-94
- 28. Mangano F, Macchi A, Shibli JA, Luongo G, Iezzi G, Piattelli A, Caprioglio A, Mangano C Maxillary ridge augmentation with custom-made CAD/CAM scaffolds. A 1-year prospective study on 10 patients J Oral Implantol 2014;40(5):561–569
- 29. Bozec L, Odlyha M Thermal denaturation studies of collagen by microthermal analysis and atomic force microscopy. Biophys J 2011;101(1):228-236
- 30. Botticelli D, Berglundh T, Buser D, Lindhe J. The jumping distance revisited: An experimental study in the dog. Clin Oral Implants Res 2003;14(1):35-42.