

Dottorato di Ricerca in Scienze Morfologiche,

Ciclo XXVI



**Analisi immunoistochimica e molecolare del pattern di
rimodellamento osseo nell'alveolo post-estrattivo**

Tutor: Prof.ssa Chiarella Sforza

Co-Tutor: Dott.ssa Claudia Dellavia

Candidato: Elena Canciani

Matricola n. R09099

Anno 2012-2013

RIASSUNTO

SCOPO

Il sito dell'alveolo post-estrattivo è un modello ampiamente utilizzato nello studio del rimodellamento osseo fisiologico o patologico e del comportamento di biomateriali per la rigenerazione ossea.

Lo scopo di questo progetto è stato quello di caratterizzare il pattern morfologico e molecolare dei marker coinvolti nel rimodellamento osseo alveolare, prima e dopo l'estrazione dentale, ed eventualmente in combinazione con un biomateriale utilizzato per preservare l'anatomia del sito ai fini riabilitativi.

MATERIALI E METODI

Per questo studio sono stati arruolati 36 pazienti, suddivisi in 3 gruppi indipendenti: osso alveolare (OA, n=14), guarigione spontanea (GS, n=10) e biomateriale (B, n=12). Durante la seduta di estrazione dentaria sono state raccolte 2 piccole biopsie per paziente per effettuare l'analisi morfologica (tessuto decalcificato) e molecolare (mRNA retro-trascritto in cDNA e Real Time-PCR) (gruppo OA). Dopo 4-6 mesi dall'estrazione dentale, sono state prelevate 3 biopsie per paziente, in concomitanza dell'inserimento dell'impianto dentale, nel sito guarito spontaneamente (GS) o mediante biomateriale (B) (idrossiapatite arricchita con magnesio). Per ogni gruppo sono state effettuate le stesse analisi del gruppo OA e l'analisi istomorfometrica (tessuto calcificato). L'analisi morfologica ha previsto: colorazione Ematossilina/Eosina per osservare un eventuale infiltrato infiammatorio, colorazione immunoistochimica dei fattori caratterizzanti il pattern di rimodellamento osseo (TNF- α , IL-6, RANK, RANKL e OPG), espressa come marcatura percentuale. L'analisi molecolare è stata effettuata sugli stessi marcatori normalizzati sul gene housekeeping 18S. Sui tessuti ottenuti per usura, è stata valutata l'osteointegrazione del biomateriale e la componente minerale mediante la valutazione delle frazioni di volume (stereologia). Per ciascun parametro sono state calcolate la media e la deviazione standard; è stato utilizzato il test di Kruskal Wallis ($p < 0,05$) per valutare le eventuali differenze tra i 3 gruppi per ogni parametro e successivo test post hoc di Wilcoxon ($p < 0,05/3$).

RISULTATI

All'osservazione i campioni raccolti non presentavano né anomalie strutturali né infiltrato infiammatorio. Sia l'analisi immunoistochimica (AI) che molecolare (AM) ha mostrato un incremento per tutti i biomarker. AI: I tre gruppi erano significativamente differenti per il marcatore TNF- α ($p < 0,05$), RANK ($p < 0,01$), IL-6 e RANKL ($p < 0,001$). Il test post hoc ha mostrato una differenza tra OA e B per RANK ($p \leq 0,01$), IL-6 e RANKL ($p \leq 0,001$); tra GS e B per IL-6 ($p \leq 0,01$). AM: Il test di Kruskal Wallis ha mostrato differenze tra i gruppi per IL-6 ($p \leq 0,05$), RANKL e OPG ($p \leq 0,001$); il test post hoc ha riscontrato una significativa differenza tra OA e B per IL-6 ($p \leq 0,01$); OA e GS per RANKL e OPG ($p \leq 0,001$); tra GS e B per IL-6 e RANKL ($p \leq 0,01$), OPG ($p \leq 0,001$). Il rapporto RANKL/OPG ha mostrato una tendenza alla riduzione dell'osteoclastogenesi nel gruppo B. L'analisi istomorfometrica ha mostrato un'alta percentuale di componente mineralizzata nel gruppo con il biomateriale; tutte le particelle innestate erano circondate da osso rigenerato che creava ponti tra di esse.

CONCLUSIONI

Rispetto al rimodellamento fisiologico tutti i marker indagati hanno mostrato un incremento in entrambi i gruppi in fase di guarigione dell'alveolo post-estrattivo. Nei siti trattati con il biomateriale si è osservato un aumento della citochina IL-6 ed una diminuzione di RANK, RANKL e OPG rispetto alla guarigione spontanea. Questo può significare un rallentamento della ricostituzione del sito anatomico, dovuto ad una possibile down-regulation dell'osteoclastogenesi. Tuttavia, l'analisi della struttura dell'alveolo ha mostrato una buona rigenerazione ossea, in entrambi i gruppi; pertanto il biomateriale analizzato può essere considerato un valido ausilio per la preservazione dell'alveolo post-estrattivo.

ABSTRACT

Immunohistochemical and molecular analysis of bone remodelling pattern in alveolar socket.

AIM

Following tooth extraction, the alveolar bone remodelling process starts.

The aim of this research project was to characterize the molecular and morphological aspects of the alveolar bone remodelling pattern before and after dental extraction and in conjunction with the use of hydroxyapatite enriched with magnesium (Mg-e HA) to preserve the post-extractive alveolar socket.

MATERIALS AND METHODS

Thirty-six patients, divided in three groups, were enrolled in this study. The studied groups were: alveolar bone (OA, n=14), spontaneous healing (GS, n=10) and biomaterial (B, n=12). The biopsies for morphological and molecular analyses were harvested during the extraction tooth session (group OA) or 4-6 months later (GS, B). In GS group, patients recovered spontaneously, while in B group Mg-e HA granules were grafted to avoid the collapse of post-extraction socket. For each group, one specimen was processed for Haematoxylin and Eosin staining and immunohistochemistry for TNF- α , IL-6, RANK, RANKL and OPG. Another specimen was processed to evaluate the gene expression of the same biomarkers by Real-Time PCR (mRNA retro-transcript into cDNA). Data were normalized on housekeeping gene 18s. In GS and B groups, ground sections were obtained to evaluate the mineral component by mean of stereological analyses.

For each parameter, statistical analyses were performed to evaluate the differences among the three groups (Kruskal Wallis, significance for $p < 0.05$); post hoc tests were made by Wilcoxon tests ($p < 0.05/3$).

RESULTS

Samples harvested from each group presented a normal structure, without evident inflammatory infiltrate. Immunohistochemical (IA) and molecular analysis (MA) showed an increment for all biomarkers. IA: The three groups were significantly different for markers TNF- α ($p < 0.05$), RANK ($p < 0.01$), IL-6 e RANKL ($p < 0.001$). Post hoc tests showed a difference between OA and B for RANK ($p \leq 0.01$), IL-6 and RANKL ($p \leq 0.001$); between GS and B for IL-6 ($p \leq 0.01$). MA: Kruskal Wallis test showed a difference among groups for IL-6 ($p \leq 0.05$), RANKL and OPG ($p \leq 0.001$); post hoc tests revealed a significant difference between: OA and B for IL-6 ($p \leq 0.01$); OA and GS for RANKL and OPG ($p \leq 0.001$); GS and B for IL-6 and RANKL ($p \leq 0.01$), OPG ($p \leq 0.001$). RANKL/OPG ratio showed a tendency towards a reduced osteoclastogenesis in group B. Histomorphometry revealed a high percentage of mineralized tissue in the grafted sites; all the residual granules were surrounded by newly formed bone, consisting in regenerated bone bridges.

CONCLUSION

Both post-extractive groups had an increase of all analysed biomarkers in respect of the physiological remodelling pattern. In the grafted sites, IL-6 values were higher than in the spontaneous healing group; in contrast RANK, RANKL and OPG were slightly lower. The present data may suggest a slowing down in the restoration of the anatomical site, possibly due to a down regulation in the osteoclastogenesis. However, the tissue composition of the grafted alveolar socket showed a good bone regeneration in both groups. Therefore, the current biomaterial could be considered a useful tool for alveolar socket preservation.

INDICE

1- INTRODUZIONE

1.1. IL PARODONTO: L'OSSO ALVEOLARE

- 1.1.1 Anatomia macroscopica
- 1.1.2 Anatomia microscopica

1.2. FISILOGIA DEL RIMODELLAMENTO OSSEO

1.3. IL RIMODELLAMENTO OSSEO ED I SUOI MARKERS

- 1.3.1 Fattori di crescita
- 1.3.2 Citochine
- 1.3.3 Citochine valutate nel progetto di ricerca
 - RANK/RANKL/OPG
 - TNF- α
 - IL-6

1.4. GUARIGIONE DELL'ALVEOLO POST-ESTRATTIVO

- 1.4.1 Fenomeni intralveolari
- 1.4.2 Fenomeni crestali

1.5. PRESERVAZIONE DELL'ALVEOLO

- 1.5.1 Biomateriali
- 1.5.2 Biomateriale oggetto di studio Mg- HA (SINTLife®)
- 1.5.3 Membrane

1.6. RIABILITAZIONE DELL'ALVEOLO POST-ESTRATTIVO RIGENERATO

1.7. SCOPO

2- MATERIALI E METODI

2.1 CAMPIONE

2.2 PROCEDURA CHIRURGICA

- 2.2.1 Istruzioni post-chirurgiche per il paziente
- 2.2.2 Controlli post chirurgici e mantenimento dell'igiene

2.3 ANALISI MORFOLOGICA: PROCESSAZIONE ISTOLOGICA DEI CAMPIONI

- 2.3.1 Prelievo bioptico
- 2.3.2 Protocollo di processazione per i tessuti decalcificati
- 2.3.3 Colorazione istochimica
- 2.3.4 Colorazione immunohistochimica
- 2.3.5 Protocollo di processazione per i tessuti calcificati (Donath 1982)

2.4 ELABORAZIONE DEI DATI E ANALISI STATISTICA

- 2.4.1 Acquisizione delle immagini
- 2.4.2 Analisi istologica qualitativa
- 2.4.3 Analisi istologica semi-quantitativa
 - Valutazione percentuale della marcatura mediante analisi di immagine (analisi semi-quantitativa)
 - Valutazione istomorfometrica mediante stereologia

2.5 ANALISI MOLECOLARE DEI CAMPIONI

- 2.5.1 Estrazione RNA da tessuto con il metodo del TRI Reagent
- 2.5.2 Quantificazione spettrofotometrica al NanoDrop
- 2.5.3 Retrotrascrizione del RNA in cDNA
- 2.5.4 RT-PCR e analisi quantitativa dei marcatori valutati

2.6 ANALISI STATISTICA

3- RISULTATI

3.1 CAMPIONE

3.2 PROCEDURA CHIRURGICA

3.3 ANALISI ISTOLOGICA

- 3.3.1 Analisi qualitativa
- 3.3.2 Analisi istologica morfologica semi-quantitativa
- 3.3.3 Mappatura dell'espressione dei biomarker
 - TNF- α : osso alveolare (OA), guarigione spontanea (GS), biomateriale (B)
 - IL-6: osso alveolare (OA), guarigione spontanea (GS), biomateriale (B)
 - RANK: osso alveolare (OA), guarigione spontanea (GS), biomateriale (B)
 - RANKL: osso alveolare (OA), guarigione spontanea (GS), biomateriale (B)
 - OPG: osso alveolare (OA), guarigione spontanea (GS), biomateriale (B)
- 3.3.4 Valutazione istomorfometrica mediante stereologia
- 3.3.5 Biologia molecolare: RT- PCR

4- DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

5- BIBLIOGRAFIA

1- INTRODUZIONE

1.1- IL PARODONTO: L'OSSO ALVEOLARE

Il parodonto rappresentato in figura 1.1, è il complesso dei tessuti di sostegno del dente. Esso è composto da: gengiva, legamento parodontale, cemento radicolare ed osso alveolare. Tali strutture hanno lo scopo principale di mantenere ancorati gli elementi dentari alle strutture scheletriche del complesso cranio-maxillo-mandibolare, permettendone la funzione masticatoria; inoltre svolge funzione protettiva del confronti di insulti traumatici ed infettivi.

Si tratta di un'unità funzionale, di sviluppo e biologica, che può variare in funzione dell'età e delle possibili alterazioni dell'ambiente orale (Riethe 1965).

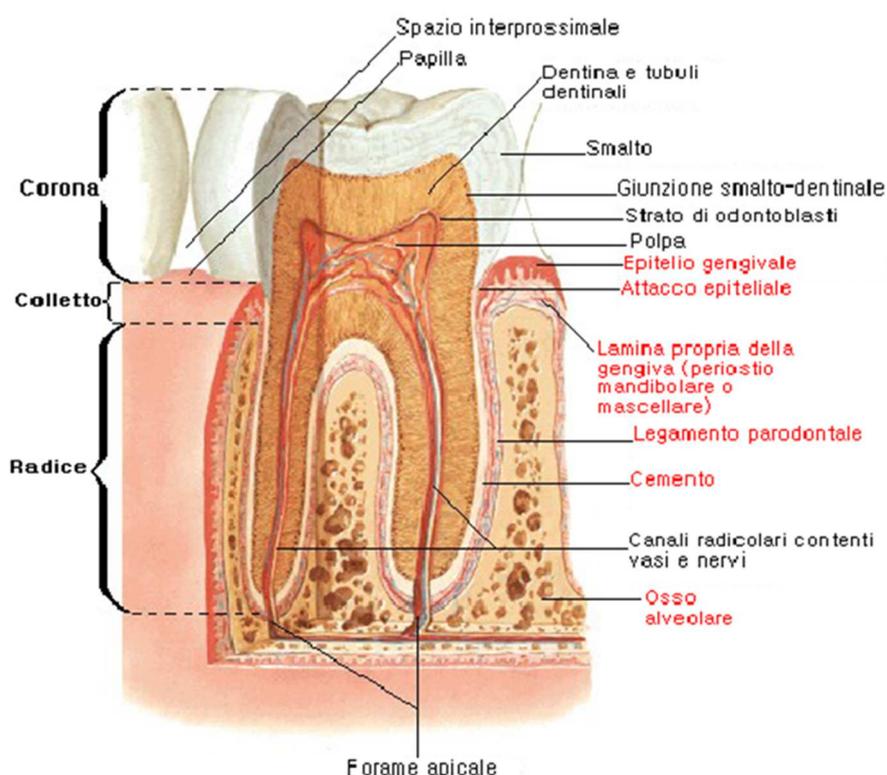


Figura 1.1

Anatomia del dente e delle sue strutture di supporto

(tratta da Netter FH. "Atlante di anatomia umana", Elsevier-Masson III ed. Milano 2007)

1.1.1- Anatomia macroscopica

L'osso alveolare rappresenta una parte del processo alveolare, il quale a sua volta è unito all'osso basale dei mascellari. Il processo alveolare è in stretto rapporto con gli elementi dentari; la loro formazione avviene in contemporanea e, quando i denti vanno perduti, anche il processo alveolare tende a scomparire gradualmente.

Le fibre collagene del legamento parodontale sono inserite nell'osso che riveste la parete dell'alveolo del dente, costituito dalla lamina corticale (bundle bone); quest'osso è chiamato osso fascicolato e le porzioni

delle fibre collagene, che sono inserite dentro all'osso fascicolato, sono chiamate fibre di Sharpey (Feneis et al. 1952). Radiograficamente l'osso alveolare si può apprezzare sia tramite riprese endorali che attraverso le immagini ortopantomografiche. Esso appare come una struttura radiopaca in cui si possono riconoscere alcune formazioni a diversa densità di mineralizzazione: la *lamina dura* che appare come una sottile banda di osso corticale; la *cresta alveolare* formata dalla fusione tra un dente e l'altro delle rispettive lamine dure; l'osso spugnoso posizionato nella parte più interna delle strutture ossee mascellari e racchiuso tra i vari versanti corticali. La trabecola tura dell'osso alveolare varia tra le diverse zone delle arcate dentarie: nelle porzioni con minore carico masticatorio la trabecolatura è sottile e fitta, mentre nelle aree più soggette a sforzo è costituita da trabecole spesse, più distanziate tra loro e disposte secondo la direzionalità delle forze gravanti (Lindhe et al. 2010).

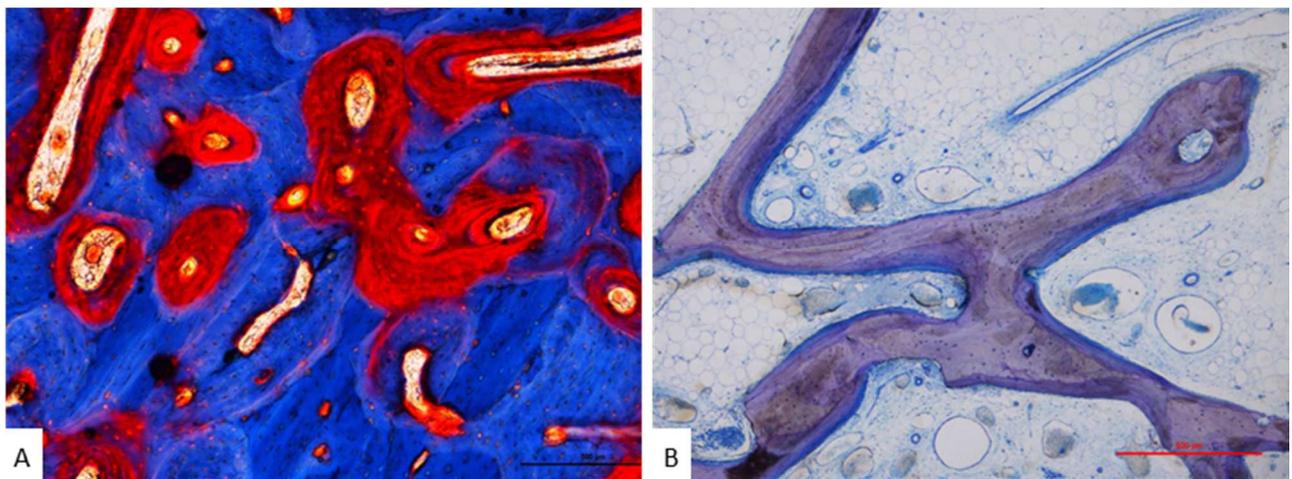


Figura 1.2

A: L'immagine mostra osso compatto caratterizzato da osteoni le cui lamelle concentriche, colorate in rosso, evidenziano un minor grado di mineralizzazione; colorazione Tricromica di Goldner modificata, sezione per usura, ingrandimento totale 100x (barra 100µm).

B: L'immagine mostra osso trabecolare, caratterizzato da trabecole ossee colorate in marrone/violetto, che circonda spazi midollari contenenti tessuto adiposo; colorazione bicromica blu di Toluidina/Pironina G, sezione per usura; ingrandimento totale 100x (barra 100µm).

1.1.2- Anatomia microscopica

Istologicamente l'osso alveolare è costituito da due tipologie di tessuto osseo: quello compatto che forma la lamina dura (porzione interna degli alveoli) e il rivestimento esterno del processo alveolare (spesso 0.1 - 0.4 mm) e l'osso spugnoso, che occupa gli spazi interni compresi tra le varie strutture dell'osso compatto per mezzo delle sue trabecolature (Lindhe et al. 2010) (Fig. 1.2).

Sia l'osso compatto che l'osso spugnoso sono costituiti da osso lamellare costituito da unità morfologiche e metaboliche definite *osteoni*. Ogni osteone è costituito da diverse lamine di matrice mineralizzata concentriche a diversa epoca di deposizione; la lamella più interna è l'ultima neo-deposta (Fig. 1.3 A); infatti nelle sezioni istologiche, è possibile apprezzare la presenza di una fila di osteoblasti adagiati su di essa a delimitare al centro, un canale vascolare chiamato *canale di Havers*. I canali di Havers sono

interconnessi tra di loro da comunicazioni laterali detti *canali di Volkmann* (Fig. 1.3 B). Tra osteoni adiacenti, gli spazi non occupati contengono lamelle dette *interstiziali*. La disposizione dei vari osteoni fornisce indicazioni strutturali, caratterizzando l'organizzazione strutturale dell'osso compatto rispetto all'osso spugnoso.

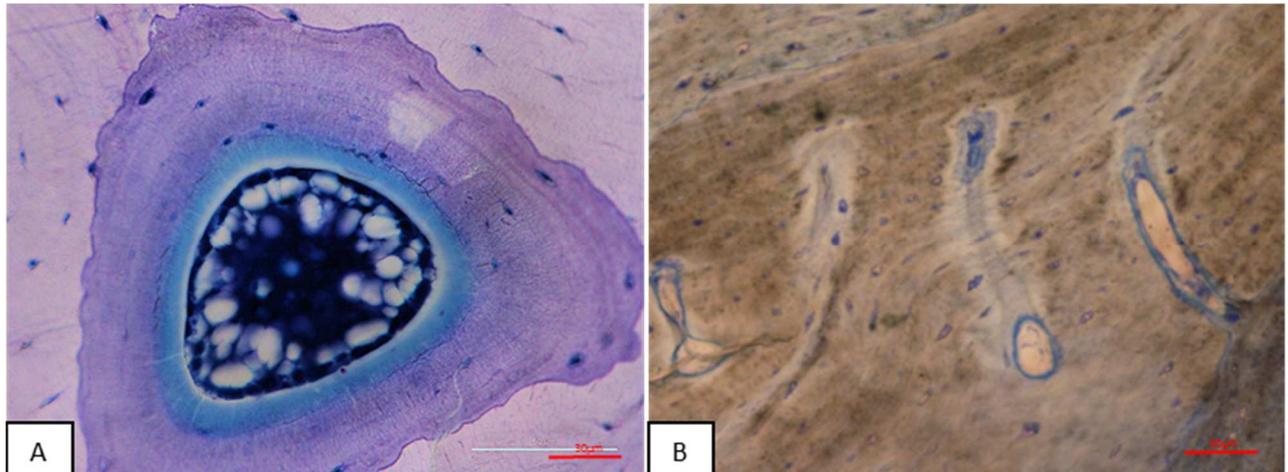


Figura 1.3

A: L'immagine mostra un osteone di neoformazione le cui lamelle concentriche colorate in blu evidenziano un minor grado di mineralizzazione; al centro è ben evidente il canale di Havers caratterizzato da vasi e terminazioni nervose; colorazione bicromica blu di Toluidina/Pironina G, preparato per usura; ingrandimento totale 400x (barra 30µm).

B: L'immagine mostra una sezione trasversale dei canali di Havers/Volkmann; l'elevata mineralizzazione fa sì che la Pironina colori di marrone scuro la matrice ossea; colorazione bicromica blu di Toluidina/Pironina G, preparato per usura; ingrandimento totale 400x (barra 20µm).

La matrice, come in tutti i tessuti connettivali, è molto abbondante. Essa è costituita da una componente organica (composta da fibre, prevalentemente di collagene I, proteoglicani e glicoproteine) che conferiscono elasticità, e da una componente minerale per circa il 65% del peso totale del tessuto. Quest'ultima è quella che dà durezza e compattezza al tessuto ed è costituita da idrossiapatite, un minerale contenente calcio combinato con ossigeno, fosforo e idrogeno.

Il corredo cellulare è costituito da:

Osteoblasti che derivano dalle cellule osteoprogenitrici residenti nel periostio e nell'endostio; sono tondeggianti e mononucleati ed hanno la funzione principale di sintetizzare le fibre e i proteoglicani e deporre matrice (Fig. 1.4 B);

Osteociti sono osteoblasti che rimangono inclusi nella matrice ossea mineralizzata durante la fase di deposizione di matrice, prendendo spazio nelle *lacune osteocitarie*; gli osteoblasti entrano in uno stato di quiescenza e prendono il nome di osteociti. Mantengono una funzione di rinnovo e mantenimento della matrice extracellulare comunicando tra loro attraverso prolungamenti citoplasmatici che percorrono i canali tra le lacune (*canalicoli osteocitari*) (Fig. 1.4 A);

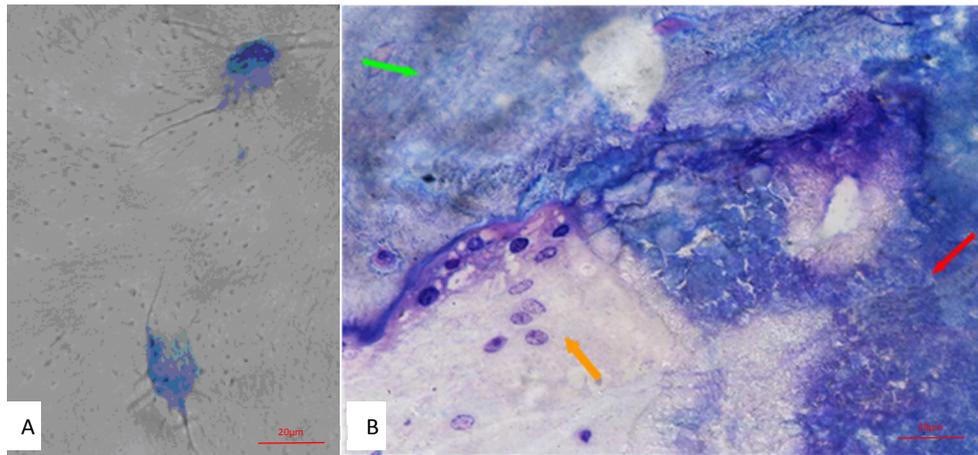


Figura 1.4

A: Nella foto sono visibili i prolungamenti degli osteociti contenuti nella lacune osteocitarie. Blu di Toluidina e Pironina G, preparato per usura; ingrandimento 600x (barra 20µm).

B: L'immagine istologica mostra un fronte di rimodellamento tra osso di neoformazione (freccia verde) ed idrossiapatite (freccia rossa). Si nota la presenza di cellule simil-osteoblastiche (freccia arancione) verso il fronte; colorazione Blu di Toluidina/Pironina G, preparato per usura; ingrandimento totale 400x (barra 20µm). (tratta da Dellavia C et al. "I colori e le forme della ricerca in odontoiatria". Quintessenza, Milano 2001).

Osteoclasti sono cellule polinucleate della linea monocito-macrofagica (Fig 1.5 B) deputate alla produzione di enzimi litici che vengono riversati sulle superfici ossee in via di riassorbimento (*lacune di Howship*) (Fig. 1.5 A). Il corretto equilibrio tra l'attività di deposizione osteoblastica e quella di riassorbimento osteoclastica assicurano il rimodellamento osseo con il mantenimento dell'omeostasi calcio-fosfatica e la morfologia del tessuto (Lindhe et al. 2010).

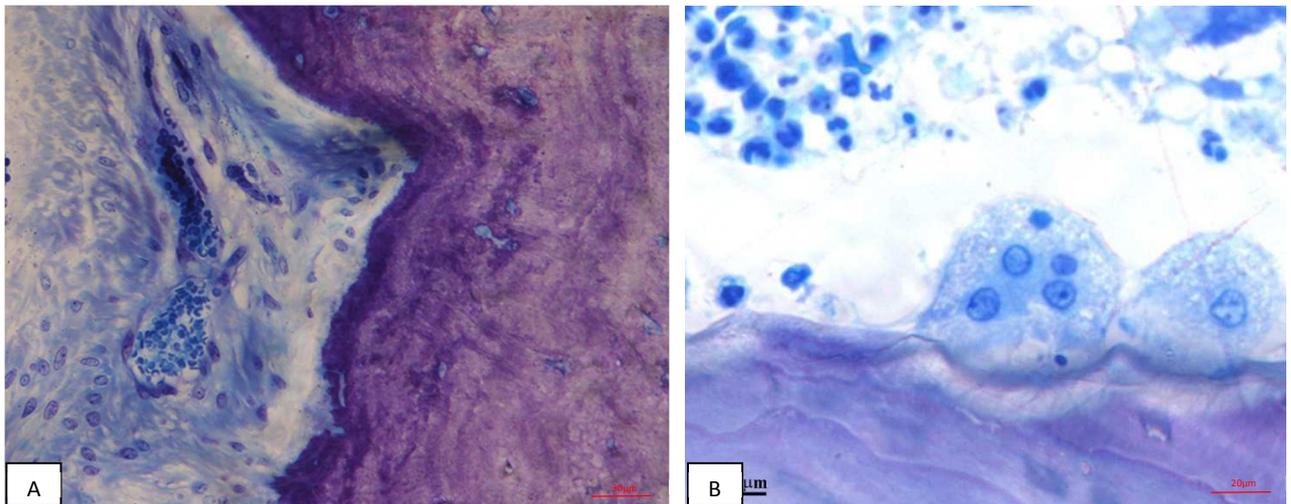


Figura 1.5

A: Lacuna di Howship; si può osservare la presenza di cellule a ridosso della lacuna. Preparato per usura, colorazione Blu di Toluidina/Pironina G; ingrandimento 400x, (barra 30µm).

B: Lacune di Howship con osteoclasti in una sezione di osso alveolare ottenuta per usura; colorazione Blu di Toluidina/Pironina G; ingrandimento 1000x (barra 10µm). (tratta da Dellavia C et al. "I colori e le forme della ricerca in odontoiatria". Quintessenza, Milano 2001).

1.2- FISILOGIA DEL RIMODELLAMENTO OSSEO

Il processo alveolare si sviluppa in concomitanza con la formazione e l'eruzione dei denti e viene gradualmente riassorbito se i denti sono persi. Inizialmente l'osteogenesi è determinata dalla deposizione di sali di calcio in aree di matrice connettivale vicine alla gemma dentale in formazione. Si creano così zone di osso immaturo, separate l'una dalle altre da matrice non calcificata, nelle quali si osservano delle lacune presto popolate da osteoblasti, osteoclasti e cellule progenitrici. Gli osteoblasti elaborano una sostanza non mineralizzata, nota come *osteoide*, formata da fibre collagene e da una matrice contenente glicoproteine e proteoglicani. L'apposizione di nuova matrice osteoide determina la mineralizzazione di quella vecchia provocando l'avanzamento del fronte di mineralizzazione (Lindhe et al. 2010).

Il tessuto osseo, una volta completata la sua formazione, è costantemente interessato da eventi metabolici che prendono il nome di *rimodellamento osseo*. Si tratta di processi di riassorbimento e apposizione della matrice tissutale che avvengono contemporaneamente e portano alla sostituzione e alla rigenerazione ciclica delle componenti biologiche del tessuto, in base alle esigenze funzionali locali (per esempio carico dentale e fenomeni eruttivi) e sistemiche (Hollinger et al. 2011). Quindi, l'insieme di tali processi permette all'osso di potersi modificare morfologicamente, in seguito a particolari stimolazioni fisiche, e di raggiungere configurazioni più adeguate ad assolvere alla funzione di sostegno dei carichi gravanti su di esso. Anche la mediazione metabolica operata dal tessuto osseo, ovvero la funzione di riserva calcica e fosfatica, è controllata e connessa ai fenomeni di rimodellamento oltre ad essere guidata da meccanismi ormonali che influiscono sul fenomeno del rimaneggiamento osseo.

In particolare, è possibile distinguere il cosiddetto *modellamento osseo* dal *rimodellamento* (Lindhe et al. 2010): il modellamento è un processo che porta alla variazione architettónica del segmento osseo (per esempio, è ipotizzato che carichi applicati su una porzione ossea diano inizio a fenomeni di neoapposizione e quindi ad un modellamento osseo in risposta ad un' aumentata attività di sostegno operata dal segmento osseo); il rimodellamento si riferisce ad un'attività interna al tessuto osseo senza concomitante variazione architettónica del segmento in cui avviene (processi di rinnovo della matrice ossea, richieste metaboliche, sostituzione dell'osso primario immaturo con quello lamellare durante il fenomeno della formazione ossea). Il rimodellamento osseo propriamente detto è possibile grazie alla presenza costante nel tessuto di *unità ossee multicellulari*, che comprendono (Fig. 1.6):

- ✓ un compartimento contenente vasi sanguigni e relativi periciti (cellule perivasali che mediante opportuna stimolazione da parte di fattori di crescita osteoinduttivi e/o osteopromotori, possono differenziarsi in osteoblasti);
- ✓ un fronte di deposizione, costituito da uno strato di osteoblasti rivolti verso una matrice organica neoformatasi che andrà in contro a mineralizzazione;

- ✓ un fronte di riassorbimento, su cui sono schierati osteoclasti residenti che agiscono verso una superficie tissutale in via di erosione formando le lacune di Howship.

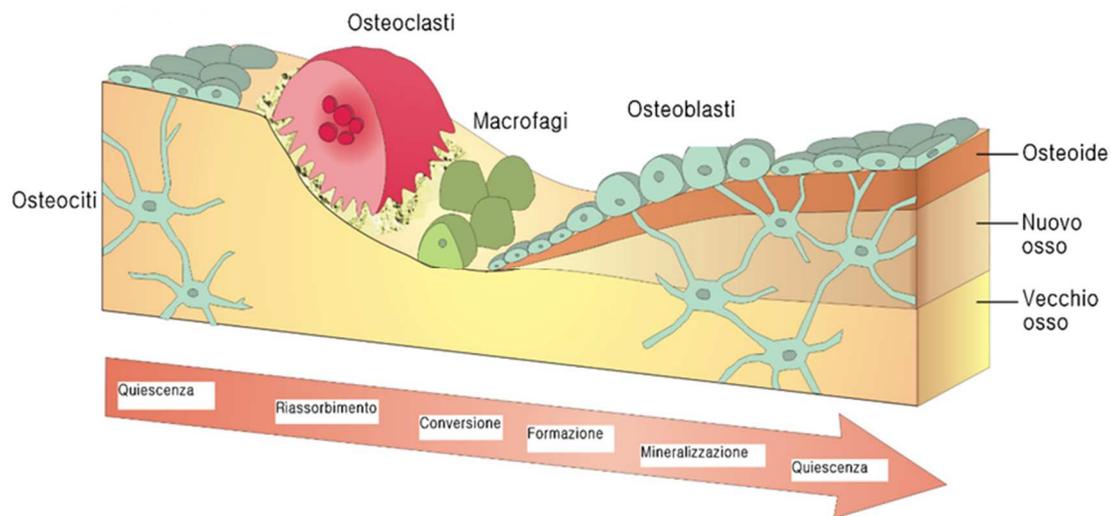


Figura 1.6
Componenti delle unità ossee multicellulari nei fronti di rimodellamento

1.3- IL RIMODELLAMENTO OSSEO ED I SUOI MARKERS

Il processo di rimodellamento è ciclico e coinvolge una complessa serie di fenomeni finemente regolati da **fattori sistemici**, come gli ormoni coinvolti sia nella regolazione dell'accrescimento scheletrico che nel metabolismo del calcio (*paratormone PTH, ormone della crescita, leptina e calcitonina*) e **locali**, come *citochine, prostaglandine ed alcune proteine*, responsabili dell'interazione tra osteoblasti ed osteoclasti (Raisz 1999; Matsuo & Irie 2008).

Molto utile risulta per lo studio della guarigione alveolare e del rimodellamento osseo, l'osservazione e la quantificazione dell'espressione di alcuni di questi fattori locali.

Le citochine sono tra i primi fattori locali di rimodellamento identificati e determinati, definite inizialmente come "fattori attivanti gli osteoclasti"; sono prodotte dalle cellule infiammatorie (in particolare dai macrofagi) e coinvolte nella perdita ossea associata alla malattia parodontale ed artrite (Lorenzo 1991, Dunstan et al. 2007). Subito dopo vennero identificate le prostaglandine come potenti fattori stimolanti il riassorbimento osseo coinvolti anche nell'infiammazione (Barrientos et al. 2008).

Ultimamente, sono state identificate alcune proteine, appartenenti alla famiglia dei recettori del TNF, responsabili dell'interazione tra il sistema osteoblastico e quello osteoclastico. I precursori osteoblastici esprimono una molecola detta TRANCE, o fattore di differenziazione osteoclastica, che è in grado di attivare le cellule di questa linea legandosi al recettore RANK. Una terza molecola, l'osteoprotegerina (OPG), viene prodotta sia da cellule osteoblastiche che midollari, fungendo da bloccante per l'interazione tra TRANCE e RANK ed inibendo la differenziazione osteoclastica. A tal proposito, alcuni studi dimostrano

che il knocking-out del gene codificante l'OPG determina gravi forme di osteoporosi nei roditori (Teitelbaum 2000; Khosla 2001; Boyle et al. 2003, Hollinger et al. 2011).

Tra i fattori di crescita i più abbondanti sono gli IGFs (Insulin-like growth factors) che grazie all'associazione con proteine di regolazione, rappresentano un importante sistema di modulazione del rimodellamento. Il transforming growth factor β (TGF- β) e la famiglia di proteine morfogenetiche dell'osso (BMPs) ad esso correlate, hanno importanti funzioni, non solo sul rimodellamento osseo ma anche su fenomeni di accrescimento scheletrico. Altri fattori di crescita come i PDGFs (platelet derived growth factors), proteine PTH-dipendenti e FGF (fibroblast growth factor) sarebbero coinvolti in prima linea nella regolazione del rimodellamento fisiologico e sembrerebbero avere un ruolo ancor più cruciale in quello riparativo (Hollinger et al. 2011).

La comunicazione tra osteoblasti e osteoclasti può avvenire in maniera diretta tramite contatti cellula-cellula dovuti all'interazioni ligando-recettore oppure indirettamente grazie alla secrezione di molecole solubili come le citochine, gli ormoni ed i fattori di crescita (Raisz, 1999; Goldring, 2003; Matsuo & Irie 2008) (Fig. 1.7, 1.8). Per operare in modo coordinato, gli osteoblasti producono una serie di molecole, tra le quali IL-1 β , IL-6 e TNF α , che agiscono sui precursori degli osteoclasti inducendoli a proliferare (Ducy et al. 2000; Matsuo & Irie 2008). L'interazione tra il recettore c-Fms (Colony stimulating factor 1 receptor) e il suo ligando M-CSF (Macrophage colony-stimulating factor) induce l'esposizione sulla membrana dei preosteoclasti di una molecola denominata RANK (recettore del fattore NF κ B), che a seguito del legame con il suo ligando RANKL, avvia la trasduzione del segnale indotta dal fattore di trascrizione NF κ B. L'iperfosforilazione dell'inibitore I κ B, la sua poliubiquitinazione e successiva degradazione ad opera del proteasoma, consente all'NF κ B di migrare nel nucleo e attivare la trascrizione di geni specifici ritenuti

indispensabili al completo differenziamento degli osteoclasti (Khosla, 2000).

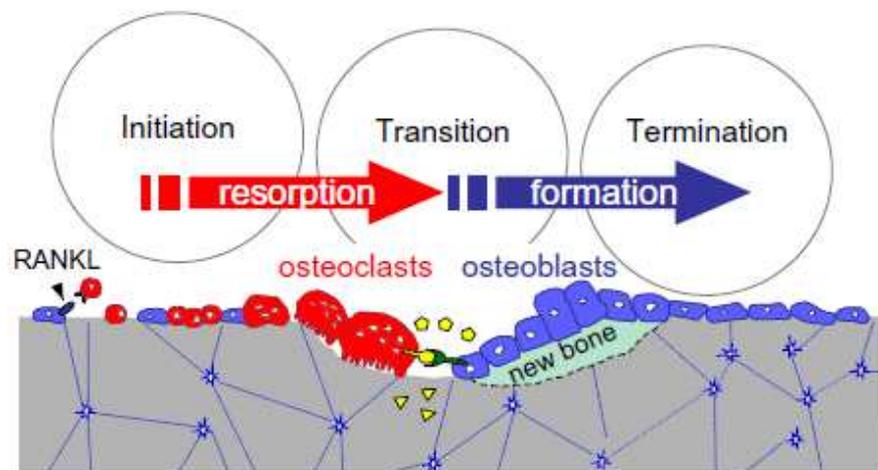


Figura 1.7

Modello raffigurante le tre fasi del rimodellamento osseo. Gli osteoclasti sono rappresentati in rosso, gli osteoblasti in blu, gli osteociti a forma di stella con i loro relativi canali (linee blu) ed in giallo, a forma di pentagono e triangolo, mediatori e fattori di crescita.

(tratta da Matsuo & Irie 2008).

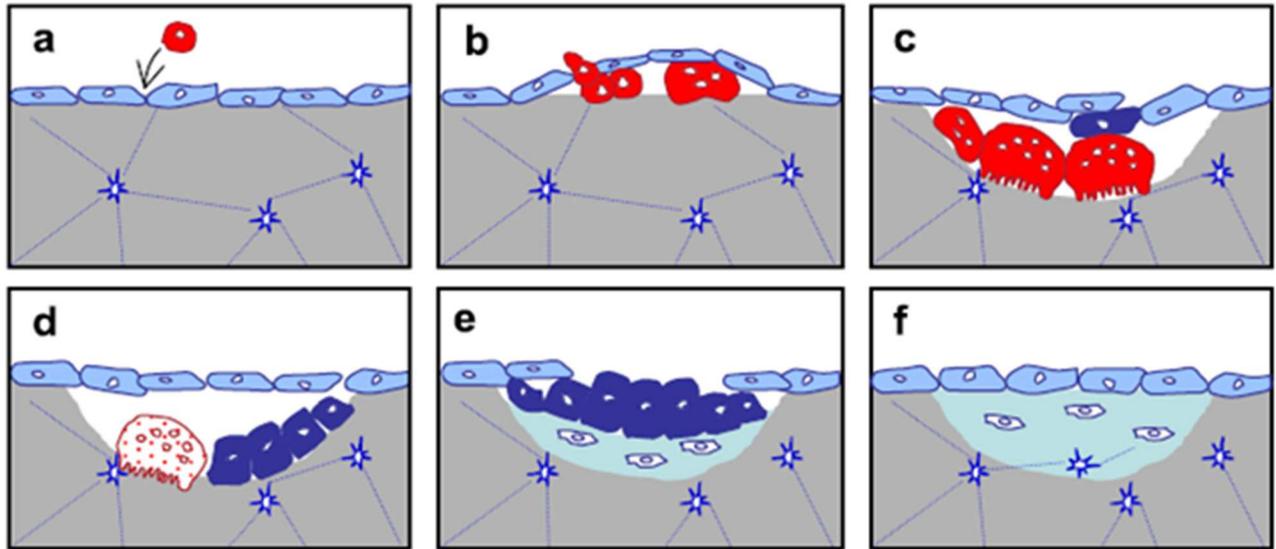


Figura 1.8

Approfondimento dello schema 1.7 che rappresenta la comunicazione tra osteoclasti e osteoblasti nelle tre fasi del rimodellamento osseo (tratta da Matsuo & Irie 2008): A-C- fase iniziale, D- fase di transizione, E-F- fase terminale. In rosso sono raffigurati gli osteoclasti e in blu/azzurro gli osteoblasti. Nella figura A- si ha il reclutamento dei precursori osteoclastici che si differenziano sulla superficie ossea da rimodellare (B). Inizia il riassorbimento da parte di osteoclasti multinucleati che inducono la differenziazione degli osteoblasti (blu) (D). Successivamente gli osteoclasti che entrano in apoptosi, rimangono nella lacuna di Howship (E) mentre gli osteoblasti depongono matrice osteoide dove verranno intrappolati diventando osteociti.

<i>Fattore di crescita</i>	<i>Fonte</i>	<i>Risposta biologica</i>	<i>Azione sull'osso</i>
BMP-2, -4, -7	Cellule mesenchimali Osteoblasti Cellule endoteliali Condrociti	Condrogenico Osteogenico Osteoinduttivo	Chemotattico Maturazione Differenziazione
FGF-1, -2	Cellule mesenchimali Osteoblasti Condrociti Cellule infiammatorie Cellule endoteliali	Angiogenesi Proliferazione delle cellule del tessuto connettivo	Chemotattico Proliferazione
IGF-I, -II	Osteoblasti Cellule endoteliali Condrociti Epatociti	Effetti anabolici e catabolici sull'osteogenesi	Chemotattico Proliferazione Maturazione Differenziazione Riassorbimento
PDGF-BB	Piastrine Osteoblasti Cellule infiammatorie Cellule endoteliali	Angiogenesi Proliferazione delle cellule del tessuto connettivo	Chemotattico Proliferazione
TGF- β	Piastrine Osteoblasti Condrociti Cellule infiammatorie Cellule endoteliali Fibroblasti	Immunosoppressione Angiogenesi Crescita e differenziazione cellulare	Proliferazione Osteogenesi Produzione di ECM
VEGF	Piastrine Osteoblasti Condrociti	Chemotattico Angiogenesi	Conversione della cartilagine in osso, chemotattico Proliferazione

Figura 1.9

Tabella riassuntiva dei fattori di crescita implicati nel processo di rimodellamento osseo. (tradotto da Hollinger et al. 2011)

1.3.1- Fattori di crescita

I pattern molecolari del tessuto osseo a livello sistemico, che coordinano i processi relativi alla regolazione del rimodellamento fisiologico e ripartivo, sono caratterizzati da un gran numero di *fattori di crescita*; tra questi i più abbondanti sono: IGFs, TGF- β , BMPs, PDGFs (*platelet derived growth factors*), VEGFs (Vascular endothelial growth factors), FGF e le proteine PTH-dipendenti (Hollinger et al. 2011) (Fig. 1.9).

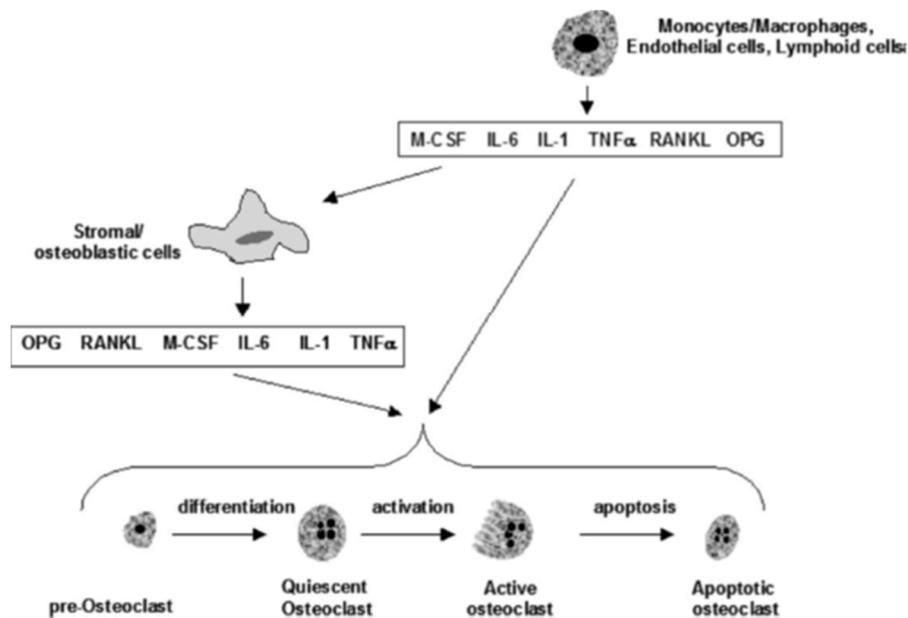


Figura 1.10

Implicazione di RANKL, OPG, IL-6, IL-1 e TNF- α sull'osteoclastogenesi (tratta da Kwan et al. 2004)

1.3.2- Citochine

Le citochine svolgono un ruolo in prima linea nel processo della risposta infiammatoria e fanno da punto di incontro tra il sistema immunitario e quello endocrino. Questa stretta rete di interconnessioni biochimiche riguarda anche il sistema scheletrico e quello immunitario. La scienza che studia queste dinamiche è l'osteimmunologia (Fini et al. 2010).

La categoria delle citochine comprende un gruppo di fattori regolatori caratterizzati da:

- Peso molecolare <80 kDa e attività biologica compresa nelle concentrazioni di ordine 10^{-10} - 10^{-13} M;
- Struttura generalmente peptidica glicosilata;
- Produzione transiente da parte di differenti gruppi di cellule nucleate;
- Attività pleiotropica;

- Funzionalità autocrina e/o paracrina;
- Multiple attività biologiche.

Non è strano, considerata l'origine ematopoietica dei precursori osteoclastici, che varie citochine tipicamente coinvolte nelle funzioni immunitarie influenzino anche i processi ossei di rimodellamento e modellamento. Degna di nota è la complessità del sistema, basato solo su due tipologie cellulari contrapposte (osteoblasti e osteoclasti) e circa 19 citochine coinvolte nella loro attivazione/inibizione/modulazione: IL-1, 3, 7, 10, 13, TNF- α e interferone- γ nella regolazione degli osteoblasti; IL-1, 3, 4, 6-8, 10-13, 15, 17, 18, 23, TNF- α (tumor necrosis factor alfa), OPG, leukocyte inhibition factor (LIF), M-CSF e interferone- γ nella regolazione osteoclastica (Hollinger et al. 2011).

Le principali citochine coinvolte nel controllo del rimodellamento osseo fisiologico sono: RANKL, RANK, OPG, M-CSF, IGF-1, IGF-2, TGF- β , IL-1, IL-6 e TNF- α (Fini et al. 2010) (Fig. 1.10).

1.3.3- Citochine valutate nel progetto di ricerca:

RANK/RANKL/OPG

RANKL è una proteina (317 aa.) transmembrana espressa dalle cellule mesenchimali, dai linfociti e dagli osteoblasti (Pivodova et al. 2011), inizialmente conosciuta come "ligando del recettore attivatore del fattore nucleare $\kappa\beta$ ", appartiene alla famiglia dei recettori del TNF ed è ligando specifico per il RANK (recettore attivatore del fattore nucleare $\kappa\beta$). La forma solubile di RANKL deriva da un clivaggio proteolitico della molecola espressa nelle cellule (Leibbrandt et al. 2008).

RANK è un peptide (616 aa.) costituito da una porzione segnale (28 aa.), un dominio N-terminale extracellulare, un corto dominio trans-membrana (21aa.) e una porzione C-terminale citoplasmatica. Viene espresso dalle cellule della linea dei monociti/macrofagi, quindi anche dai precursori osteoclastici e dagli osteoclasti maturi (Pivodova et al. 2011).

RANKL si lega al fattore RANK sulle cellule ematopoietiche e attiva proteine adattatrici citoplasmatiche (come TRAF6) che danno inizio al signaling intracellulare che coinvolge il fattore nucleare $\kappa\beta$ (NF- $\kappa\beta$) dei linfociti B attivati, la famiglia MAPK e i fattori nucleari delle cellule T, oltre al fattore citoplasmatico 1 (NFATc1) modulando l'espressione genica dei tipi cellulari coinvolti (Hollinger et al. 2011). L'espressione di RANKL, da parte degli osteoblasti, aumenta in presenza di fattori osteotropici come paratormone (PTH), prostaglandina E2 e IL-11 e il suo maggior ruolo all'interno dell'osso è la stimolazione della differenziazione e dell'attivazione osteoclastica e l'inibizione dell'apoptosi dello stesso gruppo cellulare. RANKL sembra essere sufficiente per la completa differenziazione dei precursori osteoclastici (Pivodova et al. 2011).

L'interazione tra RANKL e RANK induce, quindi, la differenziazione dei precursori osteoclastici in osteoclasti. Questa attivazione è seguita anche dall'interazione di RANK (attivato) con i membri della famiglia dei recettori TNF (TRAF) (Anderson et al. 1997).

L'attività di RANKL viene neutralizzata da **OPG**, una proteina matura di 380 aa., descritta come fattore in grado di inibire la differenziazione osteoclastica (Hollinger et al. 2011). Di conseguenza, è il rapporto molecolare tra RANKL e OPG a regolare il processo di riassorbimento osseo e a determinare, in alcuni casi, la patogenesi di disordini ossei dati da eccessivo riassorbimento (Luvizuto et al. 2010).

Il fattore OPG è dunque il freno del sistema, bloccando la funzione di RANKL. TNF- α , IL-1 e IL-6 stimolano la produzione del fattore M-CSF e direttamente l'espressione di RANKL (entrambi necessari per l'attivazione osteoclastica) (Khosla 2001). Inoltre, altre citochine e fattori, anche di tipo ormonale, come TGF- β (incremento della produzione di OPG), PTH (aumento di RANKL/diminuzione di OPG), 1,25-diidrossivitamina D₃ (incremento di RANKL), glucocorticoidi (aumento di RANKL/diminuzione di OPG) ed estrogeni (aumento di OPG) esercitano il loro ruolo regolatorio sul fenomeno dell'osteoclastogenesi e quindi sull'innesco dei processi di rimodellamento osseo. (Fig.1.11).

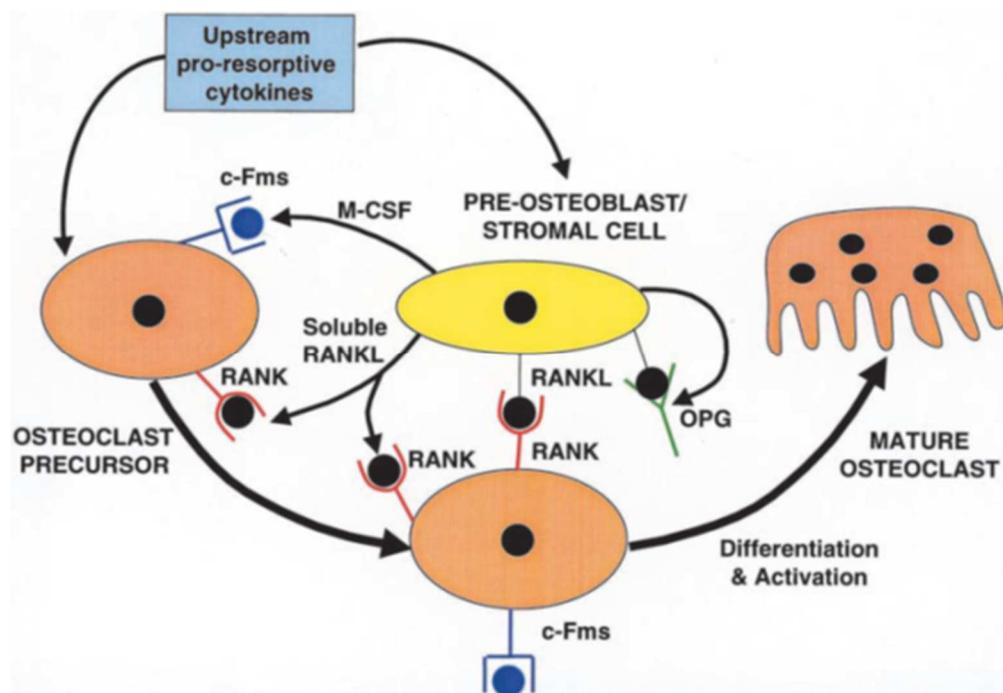


Figura 1.11
Pathway RANK/RANKL/OPG (tratta da Khosla 2001)

TNF- α

TNF- α , insieme a IL-1, giocherebbe un ruolo importante nell'attivazione del riassorbimento osseo in caso di malattie infiammatorie dello stesso (Kwan et al. 2004). Sono importanti mediatori dell'infiammazione prodotti da linfociti e da cellule mesenchimali. IL-1 è una citochina pleiotropica in grado di indurre

l'espressione di una gran varietà di altre molecole proinfiammatorie (Dinarello 1994) e citochine ematopoietiche come IL-6. Il recettore per l'interleuchina 1, tipo 1 (IL-1R1), è responsabile della mediazione della risposta consistente nel signaling della molecola; IL-1R2 è responsabile delle risposte inibitorie.

Il recettore TNFR1 per il TNF- α è espresso ubiquitariamente, mentre il recettore TNFR2 è espresso principalmente dalle cellule ematopoietiche e immunitarie. Entrambi questi recettori attivano proteine adattatrici e innescano signaling intracitoplasmatici convergenti sull'attivazione di fattori nucleari come NF- κ B e quelli appartenenti alla famiglia MAPK (importante effetto di aumento dell'espressione genica di M-CSF e RANKL).

TNF- α è una citochina multifunzionale prodotta soprattutto dai macrofagi attivati. È una delle più potenti citochine osteoclastogeniche prodotte durante l'infiammazione. Una delle sue attività è quella di mediare la stimolazione della differenziazione osteoclastica indotta da RANKL tramite meccanismo autocrino. Inoltre, è stato dimostrato che è in grado di stimolare riassorbimento osseo sia in vitro che in vivo (Kwan et al. 2004).

Il coinvolgimento della stessa citochina è stato dimostrato durante peritonite, perdita di impianti ortopedici e altre forme osteolitiche infiammatorie (Bingham 2002).

IL-6

IL-6 è un membro della famiglia di citochine che hanno come trasduttore comune del segnale gp130. Si tratta di citochine con proprietà strutturali e attività su un vario numero di cellule target, tra cui: cellule ematopoietiche, epatociti, neuroni, cellule staminali embrionali e cellule dell'osso (Heymann & Rousselle 2000).

La trasduzione del segnale portato da questa famiglia di citochine coinvolge l'attivazione di tirosin-chinasi della famiglia JAK portando ad attivazione dei fattori di trascrizione della famiglia STAT (Signal Transducers and Activators of Transcription).

IL-6 è nota per la capacità di stimolare la differenziazione delle cellule osteoprogenitrici verso la linea osteoblastica svolgendo una funzione anti-apoptotica nei confronti degli osteoblasti. La principale fonte di IL-6 nell'osso è rappresentata dagli osteoblasti, dalle cellule stromali e altre cellule non-osteoclastiche. La principale attività di IL-6 sull'osso è il suo effetto sull'osteoclastogenesi e sul riassorbimento osseo. Gli effetti di IL-6 sono interconnessi con quelli di IL-1, TNF e PTHrp e agiscono come stimolo alla formazione di cellule osteoclasto-simili a lungo termine in colture di midollo osseo umano inducendo, inoltre, il rilascio di IL-1 (Kwan et al. 2004). L'immissione di anticorpi anti-IL-1 inibisce la formazione osteoclastica IL-6-indotta (Kuhihara et al. 1990). Al contrario, IL-6 media gli effetti stimolatori di TNF (Devlin et al. 1998) e incrementa il riassorbimento osseo provocando un aumento del pool dei progenitori osteoclastici ed il loro iter di differenziazione (De la Mata et al. 1995). Quindi, IL-6, come altri fattori pro-riassorbimento,

stimola l'attività osteoclastica e il riassorbimento osseo tramite un meccanismo indiretto, ovvero incrementando le interazioni tra osteoblasti ed osteoclasti. È stato riportato da studi funzionali, che IL-6 non induce riassorbimento in colture osteoclastiche pure (Hattersley et al. 1988). Altri studi funzionali hanno dimostrato che l'espressione di recettori osteoblastici per IL-6 è necessaria (oltre alla loro presenza sugli osteoclasti) affinché si possano manifestare gli effetti indotti dalla citochina (Udagawa et al. 1995). Il primo effetto di IL-6 è stimolare, da parte degli osteoblasti, la produzione di fattori attivanti la via osteoclastica (tra cui RANKL). Secondariamente, questi fattori osteoblastici possono agire direttamente sugli osteoclasti o tramite autocrinia, stimolando ulteriormente l'attività osteoclastica di fattori paracrini diretti all'attivazione osteoclastica.

1.4- GUARIGIONE DELL'ALVEOLO POST-ESTRATTIVO

In seguito alla manovra chirurgica di avulsione dentaria, l'alveolo viene occupato da coagulo ematico che permette grazie al suo contenuto in fattori di crescita, l'inizio dei fenomeni di guarigione. Essi comportano, a livello dell'osso alveolare, delle variazioni morfologiche tridimensionali dovute al suo rimodellamento. Così come la formazione dei processi alveolari è strettamente connessa con la formazione degli elementi dentari, anche la perdita di questi ultimi è responsabile di atrofia e riduzione volumetrica dell'osso che li sostiene (Crespi et al. 2009; Crespi et al. 2011).

1.4.1- Fenomeni intralveolari

Sono molti gli studi che hanno valutato le fasi di guarigione nell'alveolo post-estrattivo (Amler 1969; Evian et al. 1982; Cardaropoli et al. 2003; Araujo & Lindhe 2005), distinguendo le seguenti tappe (Fig. 1.12):

✓ Entro le prime 24 ore dall'estrazione:

Subito dopo l'estrazione, il sangue, fuoriuscito dai vasi sanguigni recisi, e le cellule danneggiate innescano i fenomeni che porteranno alla formazione dapprima di una rete fibrinica e poi, grazie all'aggregazione delle piastrine, del coagulo ematico. Esso ha il compito di arrestare il sanguinamento oltre che fungere da portatore di sostanze importanti per il processo di guarigione e da matrice fisica per i movimenti cellulari.

✓ A distanza di 2-3 giorni dall'estrazione:

Il coagulo contiene al suo interno fattori di crescita e sostanze che promuovono la differenziazione e la migrazione delle cellule mesenchimali e l'attività di quelle infiammatorie. I neutrofili e i macrofagi migrano nella ferita per poter rimuovere i detriti; i neutrofili compaiono più precocemente e al termine del loro compito vanno incontro ad apoptosi; i macrofagi si insediano dopo i neutrofili e, oltre all'attività fagocitaria, svolgono produzione di fattori di crescita e citochine stimolanti la rigenerazione tissutale.

Quando tutti i detriti sono stati rimossi, anche i corpi apoptotici dei neutrofili vengono fagocitati dai macrofagi e può avere inizio la formazione di nuovi tessuti (tessuto di granulazione).

✓ A distanza di 4-5 giorni dall'estrazione:

Si può osservare un'evidente proliferazione del tessuto epiteliale a partire dai margini liberi dei lembi mucosi che circondano l'apertura coronale dell'alveolo, in modo che si venga a formare una copertura della massa di tessuto di granulazione contenuto all'interno della ferita;

Il coagulo, che ha riempito immediatamente il sito dopo la chirurgia, viene progressivamente sostituito da tessuto di nuova formazione, nel quale si costituisce una matrice provvisoria altamente vascolarizzata, cellulare e priva di mineralizzazione. In particolare, si innesca la migrazione delle cellule mesenchimali che iniziano a proliferare e depositare componenti della matrice in situ. Si costituisce così il tessuto di granulazione, che va a rimpiazzare gradualmente il coagulo. Esso contiene macrofagi, cellule simil-fibroblastiche e numerosi vasi sanguigni. L'intensa sintesi di componenti della matrice prende il nome di fibroplasia, mentre la formazione di nuovi vasi prende il nome di angiogenesi; attraverso la combinazione tra i due fenomeni si crea un tessuto connettivo provvisorio.

✓ A distanza di 1 settimana dall'estrazione:

Nell'alveolo in via di guarigione, si possono osservare tessuto di granulazione, tessuto connettivo neoformato e matrice osteoide in via di formazione a partire dall'estremità apicale; inoltre la lamina dura e il legamento parodontale appaiono dissolti.

✓ A distanza di 2 settimane dall'estrazione:

È stata osservata l'attivazione del processo di rimodellamento. Esso si svolge in senso centripeto, ovvero a partire dalle pareti ossee residue laterali e apicali per poi procedere verso il centro dell'alveolo e lungo le strutture vascolari. Più nello specifico, le cellule osteoprogenitrici, derivanti dalle strutture vasali (periciti), si riuniscono in vicinanza dei vasi e si differenziano in osteoblasti in grado di produrre una matrice collagenica caratterizzata da un pattern intrecciato: matrice osteoide. Gli osteoblasti continuano con la loro attività metabolica di deposizione promuovendo anche la graduale mineralizzazione del tessuto e rimanendo a volte intrappolati nella matrice come osteociti. L'osteoide viene piuttosto velocemente sostituita da un tessuto più mineralizzato ma immaturo, definito osso a fibre intrecciate o woven bone, caratterizzato sempre dalla disposizione casuale ed intrecciata delle fibre collageniche, come nell'osteoide). Un sottile strato di tessuto osseo a fibre intrecciate, molto ricco di osteoblasti, si localizza a separare l'osso alveolare residuo (bundle bone o osso fibroso) dalla matrice provvisoria accumulata al centro dell'alveolo.

✓ Dopo 3 settimane dall'estrazione:

Non è più presente tessuto infiammatorio, ma sono ancora presenti il tessuto connettivale e l'osteoido (che ormai presenta segni di mineralizzazione in corso);

✓ Dopo 4 settimane dall'estrazione:

L'osso immaturo (woven bone) occupa la quasi totalità dell'alveolo lasciando un piccolo residuo centrale di matrice provvisoria. Esso offre un'impalcatura solida, una fonte di cellule osteoprogenitrici e un notevole apporto ematico, ovvero tutto ciò che serve per avere una buona funzione cellulare e mineralizzazione del tessuto.

✓ Dopo 6-8 settimane dall'estrazione:

Risultano evidenti le trabecole ossee e l'alto grado di mineralizzazione del tessuto che riempie l'alveolo. Si osserva infatti, una progressiva e costante maturazione del woven bone (dalle 6 alle 8 settimane dopo l'estrazione), formazione di spazi midollari ad occupare buona parte dell'alveolo post-estrattivo e una sua chiusura coronale da parte di un sottile strato di osso lamellare (corticalizzazione).

L'osso a fibre intrecciate è stato quindi gradualmente sostituito da osso lamellare e midollo osseo. In questo processo si formano degli osteoni definitivi che rimpiazzano quelli primitivi dell'osso immaturo.

✓ Dopo 120 giorni fino ad 1 anno dall'estrazione:

L'alveolo appare coperto da un nuovo strato di osso corticale lamellare a foderare uno strato di woven bone. La parte più profonda, invece, è occupata da sottili trabecolature, sempre di osso lamellare, intorno alle quali si dispone tessuto midollare ricco di adipociti e povero di cellule infiammatorie (Araujo & Lindhe, 2005; Cardaropoli et al, 2003).

I risultati descritti derivano da studi pre-clinici condotti sia su cane che su uomo. Comunque, la coerenza esistente tra le due specie giustifica l'impiego di questo modello pre-clinico per osservare e comparare gli aspetti biologici riguardanti la ferita (Pellegrini et al. 2009; Giannobile et al. 1994). Analisi istomorfometriche, sullo stesso argomento nel modello umano, sono state condotte su cadavere (Boyne 1966; Amler 1969) o su pezzi biotici prelevati tramite fresa trephine a differenti tempi dopo l'avulsione dentaria e durante la preparazione del sito implantare (Carmagnola et al. 2003; Trombelli et al. 2008; Rasperini et al. 2010).

Trombelli et al. (2008) hanno descritto la guarigione post-estrattiva nell'uomo dividendone il processo in tre steps: precoce (2-4 settimane dalla chirurgia), intermedio (6-8 settimane) e tardivo (12-24 settimane). Gli autori hanno osservato, inoltre, un lento processo riparativo e rigenerativo, ma interessato da grosse

differenze interindividuali. La completa maturazione del tessuto, che porta alla formazione di osso lamellare e ampi spazi midollari ad occupare il sito post-estrattivo, è stata osservata tra 1 e 15 anni dopo l'estrazione (Carmagnola et al. 2003).

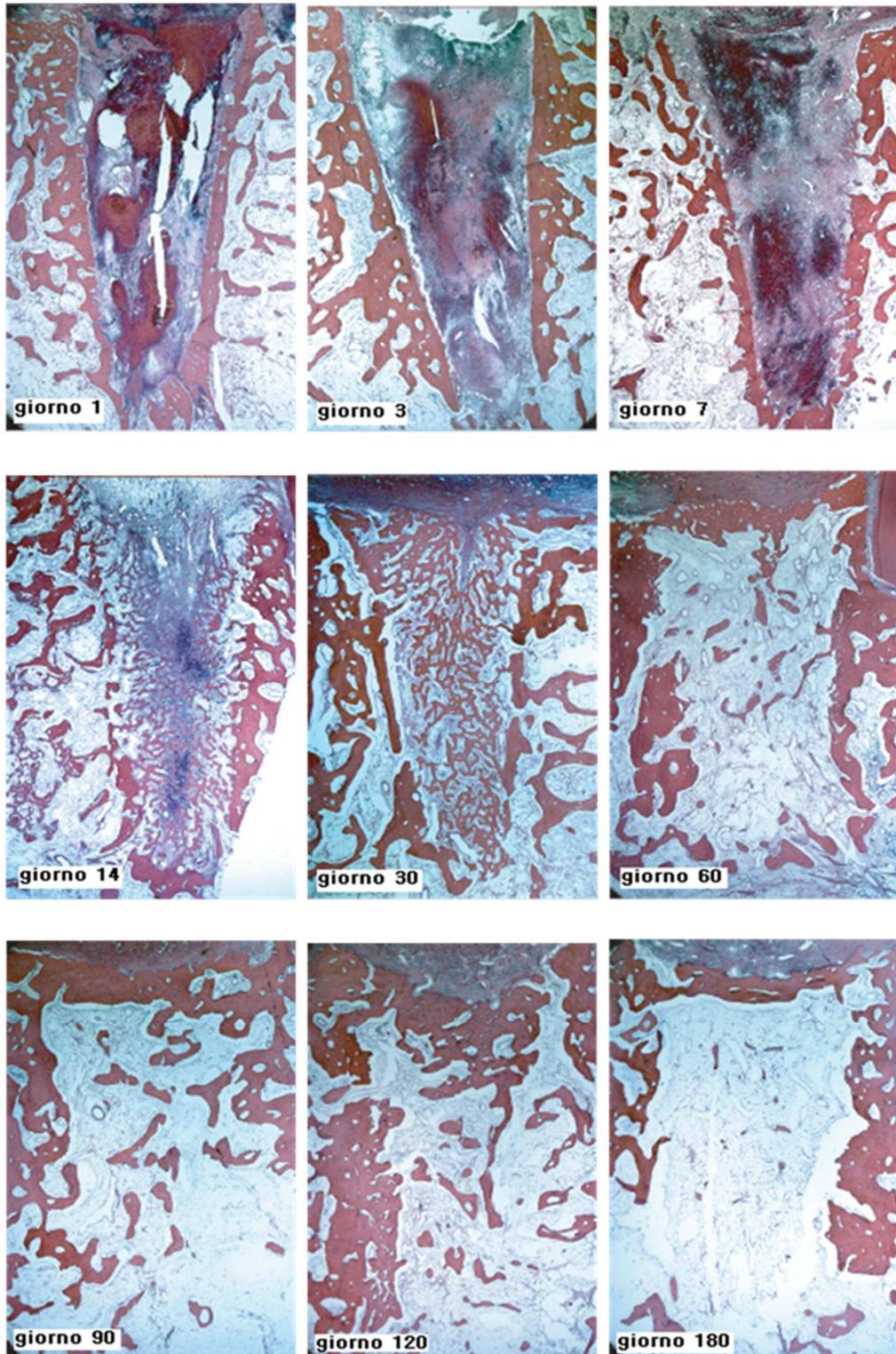


Figura 1.12
Pattern complessivo di guarigione alveolare dopo estrazione.
(tratta da Cardaropoli et al. 2003)

1.4.2- Fenomeni crestali

Molti sono gli studi che dimostrano l'alterazione della cresta alveolare in risposta ad un'avulsione dentaria, sia in modello umano che animale.

In uno studio condotto su cane (Araujo & Lindhe 2005), sono state esaminate le alterazioni della cresta alveolare edentula dopo l'estrazione dentaria. Sono stati estratti i denti premolari mandibolari di un'emiarcata previo scollamento a tutto spessore dei lembi gengivali buccale e linguale. Alla fine dell'intervento, i lembi sono stati riposizionati e suturati a coprire la cavità alveolare. Sono stati poi prelevati campioni bioptici dei singoli alveoli (sezionati sul piano bucco-linguale) dopo 1, 2, 4 e 8 settimane dalla chirurgia. Il tutto è stato eseguito per determinare le evidenze istologiche che portano al fenomeno clinico della riduzione ed atrofia della cresta alveolare in mancanza dell'elemento dentario supportato.

- ✓ 1° settimana: sulle pareti ossee residue si osservano numerosi osteoclasti e cellule multinucleate ad indicare gli imminenti fenomeni di rimodellamento in fase di partenza e il riassorbimento dell'osso fibroso (bundle bone). Questo osso si ritrova solitamente esteso negli 1-2 mm marginali della cresta buccale facendo pienamente parte dell'apparato di attacco del dente. Da ciò, in mancanza dell'elemento che è stato avulso, questo tessuto perde la propria funzione e andrà incontro a riassorbimento (Fig. 1.13 A)
- ✓ 2° settimana: la porzione esterna delle corticali del processo alveolare (ovvero quelle non coinvolte nella stabilizzazione del coagulo e non a contatto con quest'ultimo) risultano coperte da un buon numero di cellule osteoclastiche. Inoltre, in diverse parti della parete alveolare, il bundle bone risulta essere stato riassorbito e sostituito con osso a fibre intrecciate (woven bone) (Fig. 1.13 B).
- ✓ 4° settimana: numerosi osteoclasti vengono riscontrati sulla corticale buccale, mentre poche cellule sono presenti su quella linguale. Si nota un buon numero di cellule osteoclastiche anche a livello delle trabecole di woven bone all'interno dell'alveolo. Ciò indica che l'osso immaturo sta per essere sostituito da una tipologia ossea più matura (Fig. 1.13 C)
- ✓ 8° settimana: all'esterno e all'apice delle pareti ossee buccale e linguale vi sono segni che il riassorbimento di tessuto duro è in corso. La cresta del lato buccale, dove si evidenzia un maggior riassorbimento, è localizzata a un livello più apicale rispetto a quella linguale (Fig. 1.13 D). La cresta buccale è costituita da osso fibroso per circa 1-2 mm, mentre quella linguale ne possiede una frazione minore; siccome il bundle bone è un tessuto funzionalmente correlato alla presenza dell'elemento dentario esso scompare gradualmente dopo l'avulsione.

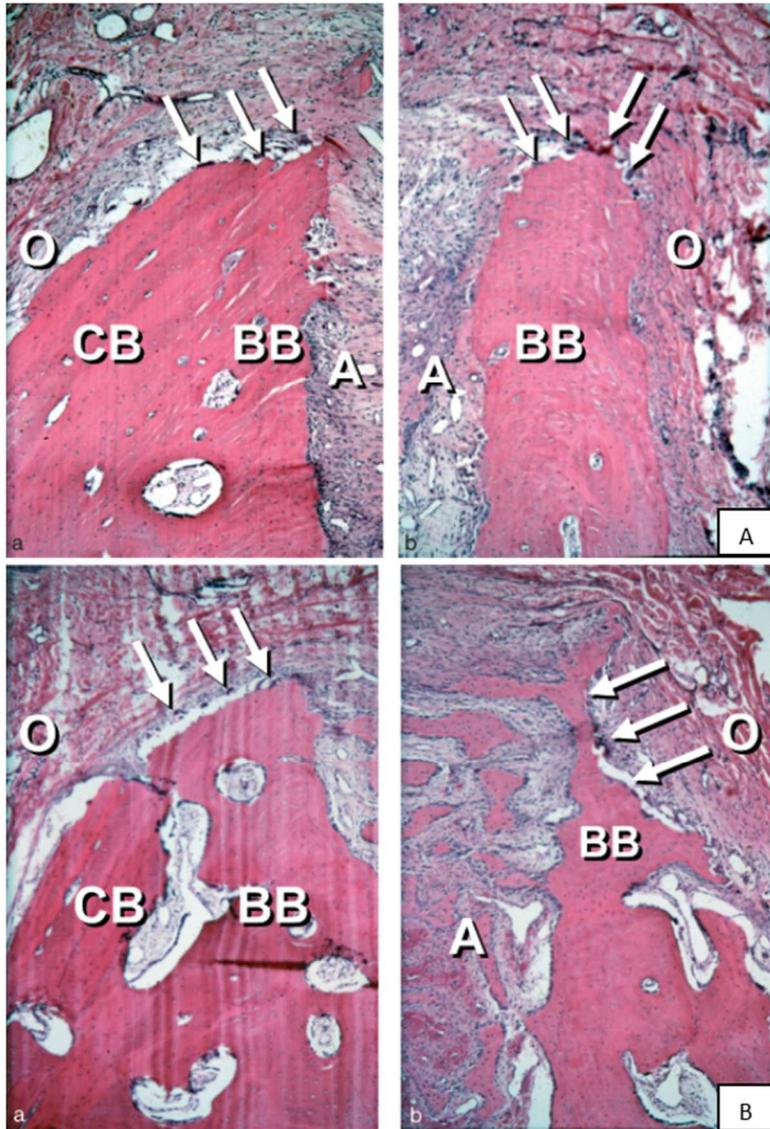


Figura 1.13

A: 1° settimana. Si nota la presenza di osteoclasti nella regione crestale (freccie).

B: 2° settimana. Grande presenza osteoclastica sul versante esterno delle regioni crestali.

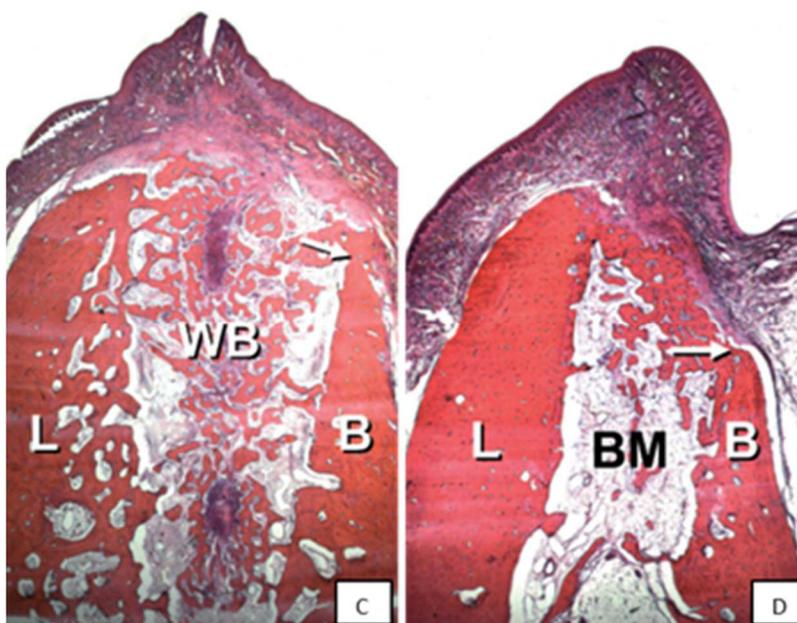


Figura 1.13

C: Visione generale dell'alveolo alla 4° settimana. Localizzazione apicale della cresta buccale (B) rispetto a quella linguale.

D: 8° settimana. Netto posizionamento apicale della cresta buccale e grande numero di osteoclasti presenti ancora sulla superficie del vecchio osso corticale. Rimodellamento del woven bone in corso.

(tratta da Araujo & Lindhe 2005)

1.5- PRESERVAZIONE DELL'ALVEOLO

Al fine di ritardare i processi di modificazione della cresta alveolare (in senso orizzontale e verticale) e di riduzione volumetrica che iniziano in concomitanza del processo di guarigione dovuto all'estrazione dentale, si ritiene opportuno preservare l'alveolo post-estrattivo per permettere una successiva riabilitazione implanto-protetica.

Le variazioni della cresta possono subire ampi range. In uno studio radiografico Tan et al. (2012) hanno quantificato il riassorbimento in senso verticale in circa 1,24 mm ed orizzontale in 3,8 mm, 6 mesi dopo l'estrazione. La severità della situazione emergente può creare due tipi di problematica clinica: difficoltà nella fabbricazione di manufatti protesici esteticamente adeguati e impossibilità o estrema rischiosità nel posizionamento chirurgico dell'impianto (Lekovic et al. 1998).

È possibile minimizzare questi problemi applicando le tecniche di preservazione dell'alveolo post-estrattivo, che impiegano l'uso di materiali da innesto (o biomateriali) con o senza l'associazione a membrane biologiche (Zubillaga et al. 2003) (Fig. 1.14).

Riassumendo, le tecniche di preservazione alveolare hanno lo scopo di (Vignoletti et al. 2012):

- Mantenere il profilo dei tessuti duri e molli esistenti;
- Mantenere il volume crestale stabile, funzionalmente ed esteticamente ottimale, con lo scopo di semplificare le procedure di trattamento nel sito edentulo.



Figura 1.14

Spesso la preservazione alveolare impiega l'associazione di biomateriali e membrane

1.5.1- Biomateriali

I materiali da innesto utilizzati fino ad oggi possono essere suddivisi in quattro categorie:

- *Innesti autologhi*: innesti trasferiti da un sito all'altro dello stesso soggetto; possono essere costituiti da osso corticale, spugnoso e midollo e sono prelevati da siti sia intra che extra-orali (Fig. 1.15 A);
- *Innesti allogenici*: sono trasferiti tra membri della stessa specie e geneticamente diversi; sono costituiti perlopiù ottenuti da osso spugnoso e midollo congelati, oppure da osso liofilizzato e congelato;
- *Innesti xenogenici*: provenienti da osso di specie diversa (Fig. 1.15 B);
- *Materiali alloplastici*: sono materiali riempitivi sintetici e/o inorganici utilizzati in sostituzione agli innesti ossei (Fig. 1.15 C-D).

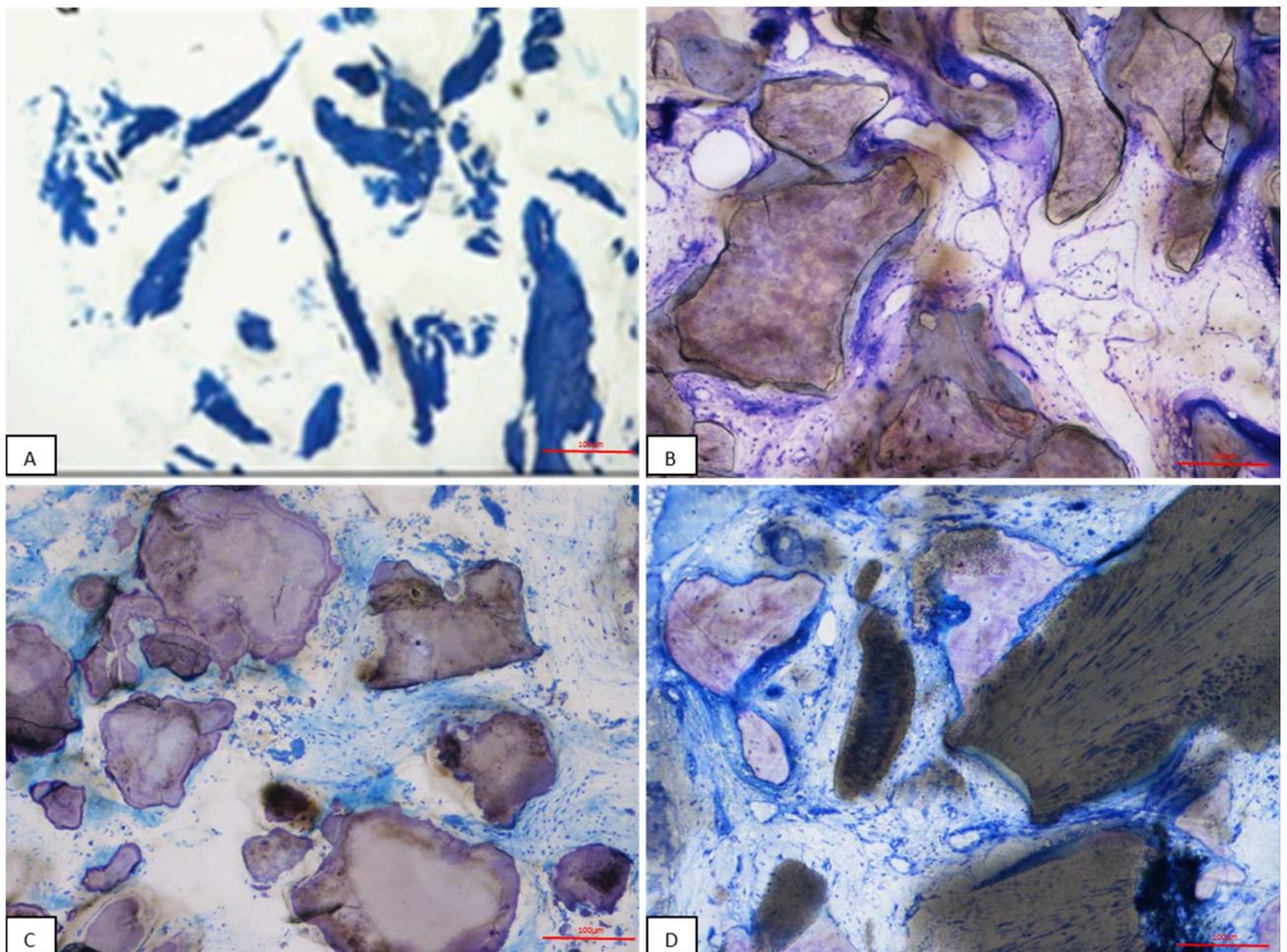


Figura 1.15

A: Esempio di innesto autologo: prelievi di osso autologo effettuati mediante bone scraper. Il preparato è ottenuto per usura; colorazione Blu di Toluidina/Pironina G; ingrandimento 100x (barra 100µm).

B: Esempio di innesto xenogenico: osso bovino deproteinizzato (Bio-Oss[®]). Il preparato è ottenuto per usura; colorazione Blu di Toluidina/Pironina G; ingrandimento 100x (barra 100µm).

C: Esempio di innesto materiale alloplastico: idrossiapatite di ultima generazione nanostrutturata (Nano bone[®]). Il preparato è ottenuto per usura; colorazione Blu di Toluidina/Pironina G; ingrandimento 100x (barra 100µm).

D: Esempio di innesto materiale alloplastico: materiale ottenuto da un procedimento di mineralizzazione delle alghe marine (Algipore®). Il preparato è ottenuto per usura; colorazione Blu di Toluidina/Pironina G; ingrandimento 100x (barra 100µm).

L'utilizzo di questi innesti o dei materiali alloplastici si basa sulle loro diverse proprietà biologiche, per le quali possono essere classificati in:

- *Materiali osteogenici*, che indurrebbero la crescita di osso alveolare grazie al loro contenuto in cellule osteogenetiche vitali;
- *Materiali osteoinduttivi*, che contengono biomolecole capaci di attrarre le componenti osteogeniche e di indurre neo-apposizione ossea (Brunsvold & Mellonig 1993; Albrektsson et al. 2001);
- *Materiali osteoconduttivi*, caratterizzati dalla capacità di fungere da impalcatura (*scaffold*) per i processi fisiologici di deposizione ossea.

L'*osso autologo* è l'unico materiale **osteogenico** considerato molto valido per le procedure rigenerative. Sebbene rappresenti il gold standard nella chirurgia ossea ricostruttiva oro-maxillofacciale (Contar et al. 2009), stanti le migliori proprietà osteoconduttive, osteogeniche e moderatamente osteoinduttive, non trascurabili sono le problematiche ad esso correlate (Bauer et al. 2000; Spin-Neto et al. 2011). La necessità di prelievo da siti intraorali o extraorali pur essendo una pratica molto affidabile (Nyström et al. 2004; Esposito et al. 2006 e 2009; Chiapasco et al. 2006 e 2009), ne limita l'uso e per questa ragione molte sperimentazioni cliniche sono perlopiù basate sull'utilizzo di innesti xenogenici o alloplastici.

I materiali allogenici, vengono notevolmente utilizzati e si presentano fondamentalmente in due forme: *freeze-dried bone allograft* - osso liofilizzato (FDBA), e *demineralized freeze-dried bone allograft* - osso liofilizzato e demineralizzato (DFDBA); essi differiscono per il meccanismo di lavorazione con il quale vengono ottenuti.

Entrambi hanno la caratteristica di essere non solo osteoconduttivi ma anche **osteoinduttivi**, per la presenza intrinseca di citochine, in particolare BMP. Questi tessuti, di origine umana, vengono prelevati da cadavere, o dal paziente che necessita di intervento chirurgico che ne preveda l'asportazione.

Nonostante le loro proprietà, l'osso omologo prevede il rischio, seppure praticamente trascurabile, di trasmissione di malattie infettive, stimato a meno di 1: 200.000 per il virus dell'Epatite C e 1:1.000.000 per il virus dell'HIV e di problematiche correlate all'istocompatibilità di tale tessuto (Contar et al. 2009; Macedo et al. 2011).

Per i motivi sopra elencati, negli ultimi anni, numerosi materiali sia sintetici che di origine biologica sono stati proposti per il riempimento di difetti ossei, tra cui idrossiapatite, calcio-fosfati, osso demineralizzato, collagene e un certo numero di polimeri e compositi.

L'idrossiapatite (HA), materiale alloplastico, è uno dei più proposti nella letteratura data la sua similarità con l'osso nella composizione chimica; esso infatti, per il 50% del volume è costituito da HA. Venne introdotta nel 1996 per le procedure di preservazione della cresta alveolare, proponendolo come materiale da applicare a una procedura di avulsione di dente dal mascellare anteriore. Gli studiosi osservarono la netta riduzione della deformazione crestale post-operatoria nel tempo, promossa dall'uso di questo tipo di innesto (Nemcovsky & Serfaty 1996).

Ad oggi è considerato un materiale biocompatibile, non immunogenico, **osteoconduttivo**, ed approvato dalla FDA (Food and Drug Administration). Si tratta di un minerale che può presentarsi in varie forme chimiche, configurazioni geometriche di superficie (da nano a micro-strutturata), che portano alla formazione di un materiale in grado di conferire una struttura biomimetica che ne migliora la rigenerazione ossea (Macchi et al. 2006).

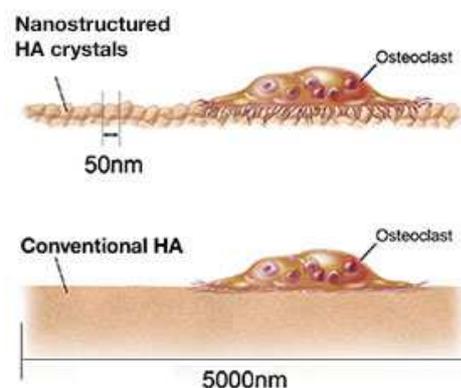
Anche i materiali xenogenici mostrano i loro vantaggi nella terapia di preservazione crestale, grazie alle loro proprietà ed all'ampia facilità di reperimento.

Questi innesti sono stati oggetto di numerosi studi clinici e pre-clinici che ne hanno mostrato il potenziale **osteoconduttivo** e la grande capacità di fare da scaffold nel processo di rigenerazione ossea. Carmagnola et al. (2003), in uno studio su 31 alveoli post-estrattivi in pazienti, ha valutato le capacità del *porous bovine bone mineral* - osso bovino deproteinizzato (PBBM), che rispetto al gruppo in cui la rigenerazione è avvenuta mediante membrana ha promosso la formazione di notevoli quantità di tessuto osteoide e woven bone attorno alle particelle d'innesto.

1.5.2- Biomateriale oggetto di studio Mg- HA (SINTLife®)

Una nuova generazione di idrossiapatiti (HAs), definite *biomimetiche*, simulano la struttura ossea, non solo dal punto di vista chimico, ma anche dal punto di vista microscopico, riproducendo microporosità e loro interconnessioni, similmente alla matrice ossea.

Studiando la guarigione alveolare, dopo innesto di HA nanocristallina sintetica, si è dimostrata la capacità di questi materiali di indurre neoformazione di vasi a partire dai vasi già esistenti nel sito. In fasi successive,



si forma una rete vascolare intergranulare probabilmente responsabile del trasporto dei precursori osteoblastici vicino ai granuli di HA (Götz et al. 2008). Ciò può essere rilevante per la valutazione delle capacità osteoinduttive e osteoconduttive del materiale, che portano ad una osteogenesi precoce e un conseguente rimodellamento dell'osso neofornato (Götz et al. 2010) (Fig. 1.16).

Figura 1.16 L'attività osteoclastica viene implementata grazie ad una maggior adesione delle cellule al biomateriale.

SINTLife® appartiene a questa nuova categoria di idrossiapatiti (HAs) e possiede una parziale sostituzione del minerale principale con magnesio (si definisce infatti Mg-enriched HA), risultando in una struttura chimica non stechiometrica (Fig. 1.17). Siccome questo materiale possiede caratteristiche chimiche e stechiometriche molto simili alla matrice ossea e nel processo di produzione non è prevista sinterizzazione, il suo innesto porta ad un notevole riassorbimento del biomateriale dopo circa 6-12 mesi (Trombelli et al. 2010).

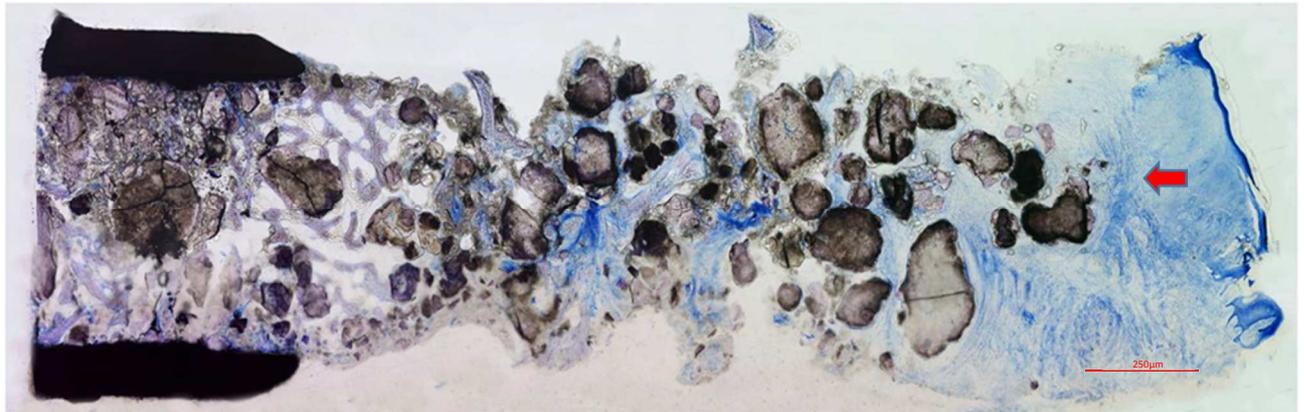


Figura 1.17

L'immagine mostra una sezione longitudinale di una biopsia ossea contenete SINTLife® prelevata a 3 mesi dall'innesto durante la procedura di posizionamento dell'impianto dentale. Il blu di toluidina evidenzia in blu/viola l'osso in fase di mineralizzazione e il tessuto molle (freccia rossa), e la Pironina G colora in marrone chiaro il tessuto osseo ben mineralizzato ed i blocchetti di biomateriale. Colorazione Blu di Toluidina e Pironina G, ingrandimento originale 5x (barra 250µm).

1.5.3- Membrane

Le membrane agiscono come barriere selettive impedendo fisicamente la crescita di tessuto fibroso ed epiteliale, senza ostacolare l'apporto ematico che, grazie a un'adeguata vascolarizzazione, permette alle cellule osteogenetiche, originate dall'osso, di rigenerarsi e colmare lo spazio vuoto.

Attualmente sono utilizzate nella pratica clinica membrane riassorbibili e membrane non riassorbibili.

Le membrane non riassorbibili sono in assoluto le membrane più utilizzate. Sono costituite da *politetrafluoretilene espanso* (e-PTFE), un materiale in grado di permettere il passaggio di liquidi ma non di elementi cellulari, e che non subisce nel tempo l'idrolisi da parte dell'organismo in cui è inserito. Tale membrana è costituita da una porzione interna, che impedisce il passaggio cellulare e fornisce la rigidità richiesta, e da una porzione esterna più porosa che permette la crescita del tessuto sovrastante. Il principale svantaggio di queste membrane è quello di richiedere un secondo intervento chirurgico per la loro rimozione e di andare incontro alla potenziale possibilità di esposizione delle stesse, con infezione del tessuto osseo sottostante e interruzione del processo rigenerativo (Di Stefano et al. 2008).

D'altro canto il vantaggio delle membrane riassorbibili è rappresentato dal fatto che, venendo degradate dall'organismo, si evita un secondo intervento per la loro rimozione. Ai fini della preservazione alveolare il materiale più utilizzato è il *collagene tipo I*, derivato dal derma o dai tendini di origine bovina, suina o equina. Esso presenta tempi di riassorbimento variabili dalle 4 alle 8 settimane. I vantaggi dell'utilizzo del collagene sono dovuti alla capacità di questo materiale di giocare un ruolo attivo nella formazione del coagulo, all'attività chemiotattica nei confronti dei fibroblasti gengivali e del legamento parodontale e al fatto che si tratta di uno dei costituenti principali del tessuto connettivo del parodonto.

1.6- RIABILITAZIONE DELL'ALVEOLO POST-ESTRATTIVO RIGENERATO

Nella sostituzione di elementi dentari mancanti si è fatto ricorso a numerosi tipi di sistemi implantari (subperiosteici, endossei a incapsulamento fibroso, endossei a lama, ecc.), ma solo gli impianti endossei a contatto osseo diretto (o osteointegrati) hanno portato a risultati accettabili dal punto di vista clinico e istologico. Infatti, essi traggono stabilità, rispetto alla compagine ossea in cui vengono posizionati chirurgicamente, grazie al principio biologico dell'osteointegrazione (Fig. 1.18).

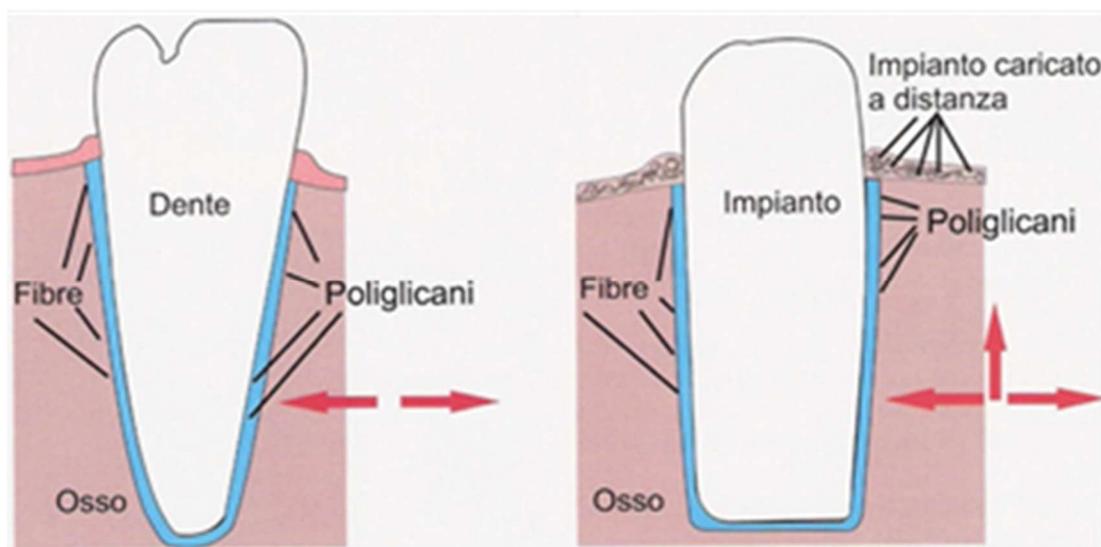


Figura 1.18

Immagine schematica raffigurante la condizione di fisio-integrazione ideale per poter caricare l'impianto, confrontata con quella del dente.

Il concetto di *osteointegrazione* è stato introdotto da Brånemark negli anni '60 e si definisce come "l'acquisizione di un contatto diretto tra osso e impianto senza interposizione di strati di tessuto molle" (Brånemark et al. 1965) (Fig. 1.19 A-B).

Un contatto diretto dell'osso alla superficie implantare è considerata la condizione ideale che si dovrebbe creare attorno all'impianto endosseo al fine di garantire una buona stabilità e un utilizzo dinamico (Fig. 1.19 A-B).

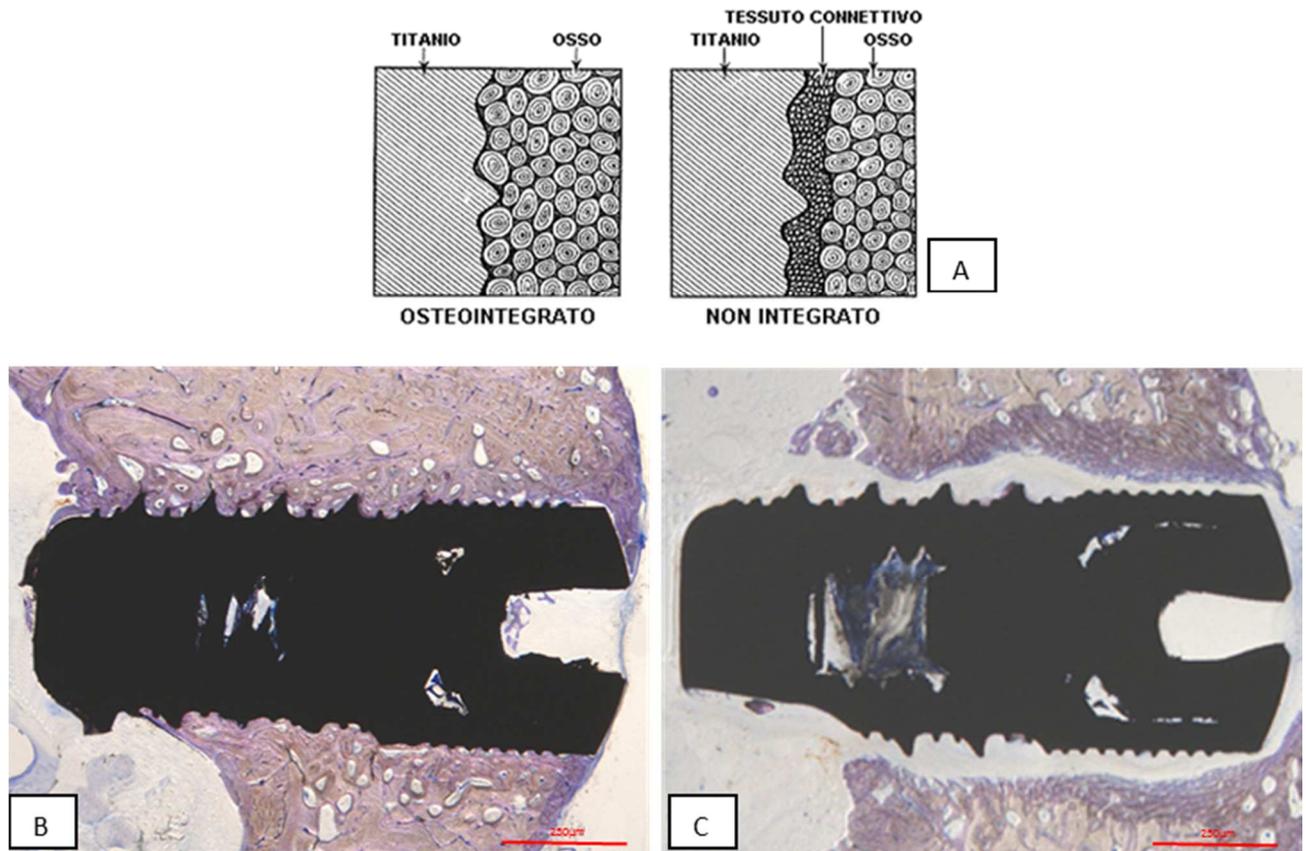


Figura 1.19

A: Schema riassuntivo del concetto di osteointegrazione e capping fibroso attorno al sito implantare.

B: Immagine istologica di un impianto osteointegrato nella corticale della mandibola; colorazione Blu di Toluidina/Pironina G, preparato per usura; ingrandimento originale 5x (barra 250µm).

C: Immagine istologica di un impianto non osteointegrato nella corticale della mandibola, circondato da un capping di tessuto fibroso; colorazione Blu di Toluidina/Pironina G, preparato per usura; ingrandimento originale 5x (barra 250µm).

Diversamente, la guarigione, tramite la formazione di un'interfaccia impianto/tessuto fibroso, porta inevitabilmente alla perdita dell'impianto (Fig. 1.19 C).

Pertanto continui studi sulle modificazioni di superfici implantari sono necessari per migliorare il processo di osteointegrazione al fine di promuovere due importanti fattori: la stabilità PRIMARIA (stabilità meccanica) e la stabilità SECONDARIA (stabilità biologica dopo il rimodellamento dell'osso) (Lorenzon 2010).

La necessità clinica di applicare delle viti implantari alle basi mascellari è quella di riabilitare funzionalmente ed esteticamente le zone edentule presenti nella cavità orale senza compromettere la salute e l'integrità degli elementi dentari naturali adiacenti al sito.

1.7- SCOPO

Il sito dell'alveolo post-estrattivo è un modello ampiamente utilizzato nello studio del rimodellamento osseo fisiologico o patologico e del comportamento di biomateriali per la rigenerazione ossea.

Lo scopo del progetto di ricerca di dottorato è stato quello di caratterizzare il pattern morfologico e molecolare dei marker catabolici (TNF- α , IL-6, RANK, RANKL) e anabolici (OPG), coinvolti nel rimodellamento osseo alveolare, prima e dopo l'estrazione dentale, ed eventualmente in combinazione con un biomateriale utilizzato per preservare l'anatomia del sito ai fini riabilitativi.

Ho lavorato attivamente per mettere a punto protocolli ad hoc per ottenere sezioni istologiche per usura e decalcificate, che consentano di affrontare un'attenta analisi istochimica ed immunohistochimica di campioni complessi da trattare, a causa della presenza di biomateriali e matrice mineralizzata.

Inoltre ho collaborato con il laboratorio di Patologia Clinica del Dipartimento di Scienze Biomediche per la Salute, al fine di trovare i metodi migliori per poter realizzare estrazioni di acidi nucleici di buona qualità, potendo così effettuare analisi molecolari attendibili nonostante la difficoltà della dimensione della biopsia e del suo contenuto.

Grazie a quest'ultima, siamo in grado di fornire una panoramica più completa sulle variazioni dell'espressione dei marker scelti; abbiamo così potuto compiere sia un'analisi morfologica, attraverso la rilevazione topografica e semi-quantitativa delle proteine coinvolte nel pattern di rimodellamento, che un'analisi quantitativa degli stessi fattori. Per rafforzare i dati ottenuti sono stati analizzati preparati per usura che hanno permesso di osservare lo stato di rigenerazione ossea e l'effettiva osteointegrazione del biomateriale.

2- MATERIALI E METODI

2.1- CAMPIONE

Selezione dei soggetti

Sono stati selezionati 3 gruppi indipendenti di soggetti costituiti da 15 pazienti ciascuno, rispondenti ad una serie di criteri di inclusione e di esclusione.

Criteri di inclusione

- Età > 18 anni
- Assenza di malattie sistemiche rilevanti e/o influenti sul metabolismo osseo
- Assenza di terapie farmacologiche interferenti col metabolismo osseo e l'infiammazione
- Non fumatore
- Assenza di terapia antibiotica almeno per i 6 mesi precedenti la seduta estrattiva
- Necessità di svolgere estrazione di dente premolare superiore
- FMPS e FMBS < 15%
- Presa visione e firma del consenso informato

Criteri di esclusione

- Stato di gravidanza o allattamento
- Presenza di problematiche peri-apicali ed endodontiche
- Presenza di tasca parodontale suppurativa
- Storia di terapia con bifosfonati
- Presenza di malattia parodontale anche su denti adiacenti a quello da estrarre
- Assenza della corticale buccale

Ogni paziente, per poter fare ingresso nello studio, ha ottenuto, letto e firmato un modulo per il consenso informato. Lo studio è stato condotto seguendo i principi delineati nella Dichiarazione di Helsinki, sulla sperimentazione coinvolgente soggetti umani.

2.2- PROCEDURA CHIRURGICA

Il dente di ogni paziente è stato estratto usando una tecnica chirurgica minimamente invasiva e senza l'impiego di lembi. Dopo l'avulsione sono stati prelevati campioni ossei dalla porzione laterale dell'alveolo residuo grazie a fresa trephine (diametro interno 2,0 mm, profondità 3,0 mm, Hu-Friedy, USA). In presenza di un difetto intraosseo sul lato desiderato per la biopsia, il prelievo è stato effettuato sulla parete ossea

opposta dell'alveolo (**gruppo osso alveolare - OA**). Questo prelievo successivamente è stato suddiviso in due parti: una per l'analisi morfologica ed una per l'analisi dell'espressione genica.

Dopo l'estrazione, i tessuti molli e duri residui sono stati curettati e l'alveolo è stato lasciato guarire spontaneamente (**gruppo guarigione spontanea - GS**) oppure trattato mediante l'innesto di granuli di biomateriale composto di idrossiapatite arricchita con magnesio (Mg-e HA) (**biomateriale - B**). I granuli sono stati miscelati con soluzione fisiologica e innestati nell'alveolo fino a 2 mm apicalmente rispetto al profilo del tessuto molle extralveolare. Un disco di collagene (Gingistat, GABA-Vebas, Italia) è stato usato per completare il riempimento coronale dell'alveolo e un FPD è stato cementato sul dente adiacente al sito post-estrattivo. La sutura è stata effettuata con un filo Gore-tex 5/0 per stabilizzare l'innesto. Successivamente all'applicazione delle procedure di preservazione alveolare, tutti i pazienti hanno subito ripresa TC.

A 4-6 mesi dall'avulsione dentale, è stato effettuato un prelievo bioptico necessario all'inserimento dell'impianto dentale, sia nei paziente del gruppo GS che in quelli del gruppo B. La carota ossea ottenuta è stata suddivisa in 3 piccole parti: 2 sono state usate per le stesse analisi del gruppo OA, la terza per l'analisi istomorfometrica.

2.2.1- Istruzioni post-chirurgiche per il paziente

Il dolore e l'edema post-operatori sono stati controllati tramite assunzione di ibuprofene. I pazienti hanno assunto 600 mg all'inizio della procedura chirurgica ed è stato comunicato di assumerne una uguale dose 6 ore dopo l'intervento. Le successive assunzioni sono state effettuate solo in caso di necessità di controllo del dolore. I pazienti con ulcera, gastrite e altre controindicazioni ai FANS hanno assunto paracetamolo (500 mg) con la stessa distribuzione temporale.

Tutti i pazienti sono stati informati di applicare intermittenemente del ghiaccio sulla zona interessata (5 min. applicato, 5 min. non applicato; per le prime 2 ore successive all'intervento).

Inoltre, è stato consigliato di interrompere lo spazzolamento per evitare di traumatizzare il sito chirurgico; l'igiene è stata comunque supportata prescrivendo sciacqui di 60 sec. L'uno con collutorio a base di clorexidina digluconato 0,12%, da eseguirsi 3 volte al giorno per le prime 2 settimane.

2.2.2- Controlli post chirurgici e mantenimento dell'igiene

Le suture sono state rimosse dopo 10 giorni. Nella stessa seduta, i pazienti sono stati istruiti a iniziare lo spazzolamento dei denti con uno spazzolino morbido post-chirurgico da effettuarsi nelle settimane successive. Due settimane dopo la chirurgia, il paziente ha potuto riprendere la normale tecnica di spazzolamento. I successivi appuntamenti di controllo sono stati fissati a 1, 2, 4, 6 e 12 settimane. Ad ogni

visita, il clinico ha valutato i pazienti, in modo da individuare eventuali effetti indesiderati e/o complicanze e provvedendo al loro trattamento in caso di necessità.

2.3- ANALISI MORFOLOGICA: PROCESSAZIONE ISTOLOGICA DEI CAMPIONI

2.3.1- Prelievo bioptico

- **Gruppo OA:** durante la seduta di estrazione dentaria, è stata prelevata una biopsia per ogni paziente (successivamente divisa in due parti): una è stata inviata al nostro Laboratorio Sezioni Sottili del Dipartimento di Scienze Biomediche, Chirurgiche e Odontoiatriche (Università degli Studi di Milano) per l'analisi istochimica ed immunohistochimica, mentre l'altra al Laboratorio di Patologia Clinica dello Dipartimento di Scienze Biomediche per la valutazione genica dei fattori presi in esame.

- **Gruppo GS e B:** a 4-6 mesi dall'avulsione dentale è stata prelevata una biopsia per ogni paziente che è stata suddivisa in tre parti: due sono giunte al nostro laboratorio dove sono state processate sia per le analisi effettuate nel gruppo OA che per l'analisi istomorfometrica; la terza è stata processata per l'analisi molecolare come per il gruppo OA.

Giunte in laboratorio, le biopsie, hanno intrapreso due differenti vie di processazione:

- Decalcificazione del tessuto: al fine di poter effettuare colorazioni istochimiche ed immunohistochimiche (gruppi OA, GS e B)

- Senza decalcificazione: al fine di poter effettuare la quantificazione istomorfometrica su preparati ottenuti per usura (GS e B).

2.3.2- Protocollo di processazione per i tessuti decalcificati

Per arrestare l'attività biologica, i campioni sono giunti in laboratorio in fissativo (formalina/0.1M al 4%); dopo 48h, sono stati tamponati in tampone salino fosfato (PBS, pH 7.4), per eliminare l'eccesso di formalina e successivamente immersi in soluzione decalcificante Osteodec (Bio-Optica, Milano) a base di EDTA (acido etilendiamminotetraacetico) per un periodo di 3 giorni. Per poter assicurare la completa rimozione dei residui di soluzione decalcificante, i campioni sono stati lavati in acqua corrente per 2 giorni. Successivamente ciascun prelievo bioptico è stato disidratato in scala alcolica crescente (70%, 80%, 90%, 96%, 100%), chiarificato in xilolo per permetterne l'infiltrazione e la successiva inclusione in paraffina (Paraplast Plus, Bio optica, Milano).

I blocchetti ricavati sono stati tagliati al microtomo ottenendo delle sezioni spesse 6 µm. Dopo asciugatura a 37 °C per 24 h i vetrini hanno subito procedimento di sparaffinatura e reidratazione in scala alcolica

decescente (xilolo, 100%, 96%, 90%, 80%, 70%, acqua distillata) prima di subire colorazione istochimica ed immunoistochimica.

2.3.3- Colorazione istochimica

Per l'analisi della morfologia dei campioni è stata eseguita una colorazione con Ematossilina/Eosina di Carrazzi. La colorazione Ematossilina/Eosina è una delle più comunemente usate e permette di valutare le caratteristiche morfologiche e citologiche del tessuto. L'ematossilina è un colorante naturale estratto dal legno di una leguminacea: si tratta di una tintura basica che si lega alle componenti cellulari acide mettendone in particolare evidenza i nuclei, che assumono una colorazione blu-violetto. L'eosina è un colorante artificiale con caratteristiche acide che si lega alle strutture subcellulari aventi un pH alcalino come, ad esempio, il citoplasma. Questa colorazione viene definita combinata, in quanto dapprima si immergono i vetrini nella soluzione di ematossilina, colorando i nuclei, successivamente dopo il lavaggio e il viraggio della tintura nucleare in acqua di fonte, le sezioni vengono inserite in una soluzione di eosina dove il citoplasma e la matrice extracellulare si tingono di rosa (Fig. 2.1 A-B).

L'analisi è stata effettuata su una sezione per ciascun campione fotografato all'ingrandimento totale di 20x e 400x (Eclipse 600, Nikon).

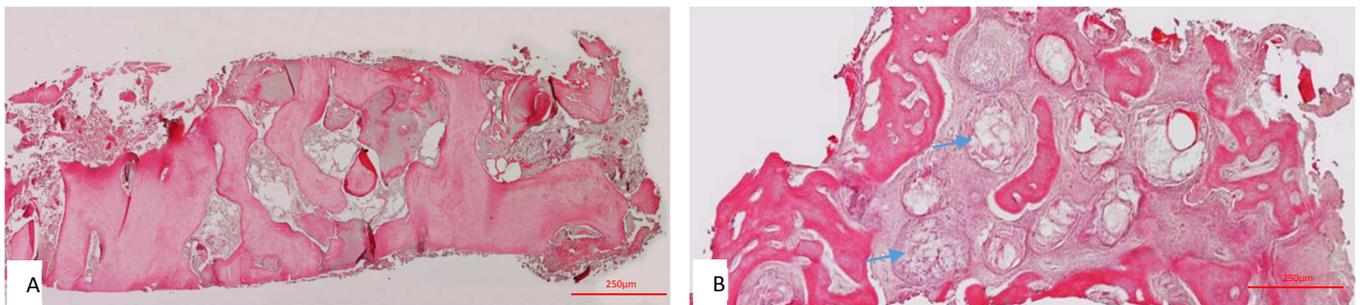


Figura 2.1

A: L'immagine mostra una sezione longitudinale di prelievo osseo ottenuto mediante fresa carotatrice del gruppo OA dove è possibile osservare l'integrità strutturale del campione. L'osso risulta essere compatto ed altamente mineralizzato (colore rosa, e circondato da spazi midollari. Colorazione Ematossilina/Eosina di Carrazzi, ingrandimento totale 20x (barra 250µm).

B: L'immagine mostra una sezione longitudinale di prelievo osseo del gruppo che ha subito innesto di biomateriale. È possibile osservare la struttura ossea normale, e l'assenza di infiltrato infiammatorio negli spazi midollari attorno ai granuli. Il colore purpureo dell'eosina, indica che l'osso si trova in fase di mineralizzazione. Le frecce azzurre, indicano che i blocchetti di biomateriale sono stati circondati da matrice osteoide. Colorazione Ematossilina/Eosina di Carrazzi, ingrandimento totale 20x (barra 250µm).

2.3.4- Colorazione immunoistochimica

La tecnica immunoistochimica si basa sul principio di coniugazione antigene-anticorpo in addizione a sistemi di rivelazione (enzimatici o fluorescenti) che rendono visibile l'avvenuta reazione al microscopio.

Esistono metodiche dirette o indirette. Nelle metodiche dirette si utilizza un unico anticorpo in grado di legare specificamente la molecola da ricercare e lo stesso anticorpo lega anche una sostanza colorata che ne permette la visualizzazione. Nelle metodiche indirette si utilizzano due anticorpi: il primo diretto contro la molecola da ricercare, il secondo, coniugato con la sostanza colorata, andrà a legarsi al primo anticorpo.

In questo studio è stata effettuata la metodica indiretta seguendo il protocollo che ha previsto le seguenti fasi previste dal kit (UltraVision Quanto Large Volume Detection System HRP Polymer, Bio-Optica, Milano), un sistema polimerico che viene rivelato mediante colorazione con DAB - 3, 3'-diaminobenzidine - (DAB Quanto Substrate System, Bio-Optica, Milano). La colorazione è stata effettuata su quattro sezioni per ciascun fattore entro ciascun paziente:

1. Smascheramento dell'antigene, mediante incubazione con Proteasi K a 37°C per 20 minuti.
2. Bloccaggio delle perossidasi endogene mediante perossido di idrogeno al 3% diluito per 10 minuti.
3. Bloccaggio delle proteine sieriche con il bloccante Ultra V, incubando i campioni per 5 minuti a temperatura ambiente allo scopo di bloccare la colorazione di fondo aspecifica.
4. Incubazione con anticorpo primario mediante l'utilizzo dei seguenti anticorpi primari a temperatura ambiente per 60 minuti in diluizione 1:100 (Santa Cruz Biotechnology inc., CA, USA):

TNF- α : sc-52746, anticorpo monoclonale anti-uomo in topo, che lega tutta la molecola;

IL-6: sc-130326, anticorpo monoclonale anti-uomo in topo, che lega tutta la molecola;

RANK: sc-52951, anticorpo monoclonale anti-uomo in topo, che lega la porzione amminoacidica 326-616;

RANKL: sc-52950, anticorpo monoclonale anti-uomo in topo, che lega la porzione amminoacidica 1-317;

OPG: sc-11383, anticorpo policlonale anti-uomo in coniglio, che lega la porzione amminoacidica 153-401.

5. Intensificazione dell'anticorpo primario mediante l'intensificatore dell'anticorpo primario, per 10 minuti a temperatura ambiente. L'intensificatore ha la funzione di anticorpo secondario marcato con biotina.

6. Incubazione con polimero quanto-HRP per 15 minuti a temperatura ambiente. Questo polimero sostituisce l'avidina che reagisce con la biotina. L'avidina è una glicoproteina, presente nell'albume dell'uovo, che si lega saldamente alla biotina e forma il complesso avidina-biotina amplificando così il segnale. Essa presenta quattro siti di legame, tre dei quali impegnati dell'enzima perossidasi e uno impegnato dalla biotina.

7. Incubazione con cromogeno DAB che viene ossidato dai radicali liberi formati dall'azione della perossidasi presente sull'avidina con il perossido d'idrogeno, conferendo alla DAB il caratteristico colore marrone.
8. Contro-colorazione con ematossilina di Mayer per meglio visualizzare i nuclei cellulari e la morfologia tissutale all'osservazione microscopica.
9. Disidratazione mediante scala alcolica crescente veloce (70%, 90%, 96%, 100%, xilolo), montaggio con Micromount (Carlo Erba reagenti) e vetrino copri-oggetto per proteggere la sezione.
10. Le analisi sono state effettuate su fotografie al microscopio in campo chiaro, all'ingrandimento totale di 20x, 200x e 400x (Eclipse 600, Nikon).



Figura 2.2

Strumentazioni del Laboratorio di analisi di sezioni sottili per la preparazione dei campioni per usura.

2.3.5- Protocollo di processazione per i tessuti calcificati (Donath & Breuner 1982)

Questo protocollo è stato applicato ai prelievi bioptici ossei senza rimozione della parte minerale al fine di valutare mediante analisi qualitativa istomorfometrica, l'osteointegrazione delle particelle di biomateriale nei confronti dell'osso neoformato e le percentuali delle frazioni di volume dei tessuti che compongono le biopsie. Tale metodica risulta fondamentale per mantenere l'integrità strutturale dei campioni.

Tutti i campioni sono stati fissati, in formalina/0.1M al 4% per circa 10 giorni, per ridurre e arrestare l'attività biologica; successivamente hanno subito le seguenti fasi:

1. Disidratazione

Dopo lavaggio in PBS (pH 7.4), per eliminare l'eccesso di formalina, ciascun prelievo biotico è stato disidratato in scala alcolica crescente (70%, 80%, 90%, 96%, 100%) per permetterne l'infiltrazione e l'inclusione in resina. Il campione è stato immerso nella seguente scala crescente di alcool; ogni passaggio è durato 24h per ciascun mm di spessore del prelievo biotico, in agitazione continua:

2. Infiltrazione in resina

Dopo aver disidratato i campioni, è stato possibile includerli in resina di polimetil-metacrilato, Technovit 7200 VLC (Kulzer, Bio-Optica, Milano, Italia), in rapporti crescenti tra resina e alcool (1:3, 1:1, 3:1), fino ad arrivare all'infiltrazione in resina pura. Ciascun passaggio ha richiesto: 3 giorni per ciascun mm di spessore del campione. I campioni sono stati: lasciati in agitazione continua ed al buio per evitare la polimerizzazione precoce della resina, hanno subito passaggi sottovuoto per migliorare l'infiltrazione riducendo le bolle di aria intrappolate nella struttura ossea del campione, mantenute a temperatura ambiente per evitare la formazione di depositi di resina.

3. Polimerizzazione

I campioni, dopo l'infiltrazione in resina pura, sono stati inclusi mediante l'uso di una polimerizzatrice a luce bifasica bianca e blu, per creare il blocchetto solido contenente il campione (Polimerizzatrice Exakt 520, Bio Optica, Milano).

4. Taglio ed incollaggio

Ricavate dal campione le sezioni di interesse utilizzando una troncatrice con lama diamantata e provvista di un dispositivo micrometrico (Micromet, Remet, Bologna), sono state incollate mediante colla a base di metil-metacrilato Technovit 7210 (Kulzer, Bio Optica, Milano) su di un vetrino istologico di materiale plastico (Kulzer, Bio Optica, Milano), compatibile con la resina, mediante l'utilizzo di una macchina da incollaggio (Exakt 402, Bio Optica, Milano), sottovuoto per 10 minuti.

5. Assottigliamento e lucidatura

I preparati sono stati assottigliati a circa 100-150 μm con una levigatrice (Remet LS2, Bologna) utilizzando carte abrasive con grana decrescente da 180 a 2500 e controllati con spessimetro. Sono infine stati lucidati con un apposito panno morbido (Durlap) ed una soluzione contenente allumina 0,05%.

6. Colorazione del campione con Blu di Toluidina/Pironina G

E' stata utilizzata la tecnica di colorazione bicromica basica con blu di toluidina e pironina G che, rispetto ad altre colorazioni, permette di evidenziare con chiarezza la presenza di tessuto osseo in diversi gradi di mineralizzazione, attraverso la tinta in scala di blu e marrone e di eventuali biomateriali.

La tecnica prevede pulitura con alcool delle sezioni, immersione in H₂O₂ al 30% (Carlo Erba reagenti) in agitazione per circa 20 minuti. Dopo lavaggio sotto acqua di fonte per 5 minuti, le sezioni sono state immerse nella soluzione di blu di toluidina e pironina G, in agitazione e alla luce, per un tempo di circa 50 minuti.

Per ogni campione sono state ottenute due sezioni, che sono state mappate al microscopio ottico all'ingrandimento totale di 100x e sulle quali è stata effettuata l'analisi istomorfometrica.

2.4- ELABORAZIONE DEI DATI E ANALISI STATISTICA

2.4.1- Acquisizione delle immagini

Tutte le sezioni sono state valutate al microscopio ottico a luce trasmessa in campo chiaro (Eclipse E600, Nikon) tramite diversi obiettivi: 2x, 10x, 20x, 40x. Il microscopio è equipaggiato con macchina fotografica digitale (DXM1200, Nikon, Tokyo, Japan) che permette di effettuare fotografie digitali. L'acquisizione delle immagini è stata effettuata con il programma NIS-Elements (Nikon Instruments Inc.).

2.4.2- Analisi istologica qualitativa

La colorazione Ematossilina/Eosina ha permesso la valutazione qualitativa dei preparati dei campioni. Si è accertata l'integrità strutturale dei tessuti, la presenza/assenza e localizzazione di un eventuale infiltrato infiammatorio (gruppi OA, GS e B).

2.4.3- Analisi istologica semi-quantitativa

A. Valutazione percentuale della marcatura mediante analisi di immagine (analisi semi-quantitativa)

La colorazione immunostochimica è stata osservata al fine di poter effettuare un'osservazione topografica della distribuzione delle marcature per ogni singolo fattore di rimodellamento in ciascun gruppo sperimentale (gruppi OA, GS e B). Successivamente le immagini digitali effettuate sono state analizzate mediante l'utilizzo di un programma di immagine (PhotoShop CS3), al fine di dare un valutazione semi-quantitativa della marcatura rilevata.

È stato determinato un range di colori che indicasse l'avvenuta marcatura al fine di quantificarla come frazione del numero di pixel marcati su pixel totali dell'immagine. È stata quindi calcolata la percentuale di marcatura per ogni singola immagine e successivamente si è calcolato il valore medio per ciascun marker in ciascun paziente (gruppi OA, GS e B).

B. Valutazione istomorfometrica mediante stereologia

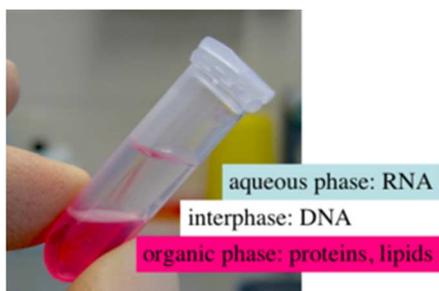
L'analisi istomorfometrica, su preparati per usura, ha permesso di valutare le percentuali di osso neoformato, matrice osteoide, spazi midollari ed eventualmente di biomateriale residuo nei campioni analizzati. Le percentuali di frazione di volume delle diverse componenti della biopsia sono state calcolate mediante il principio della probabilità geometrica su uno spazio bidimensionale, ed assunte ad uno spazio tridimensionale. La procedura prevede l'utilizzo di una griglia con un numero di punti di intersezione noto. Si procede calcolando il numero dei punti di intersezione giacenti su ogni tipologia di tessuto. Alla fine si calcola il rapporto tra il numero dei punti test per ciascun tipo di componente sul totale dei punti test della griglia, ottenendone delle percentuali. Successivamente sono state calcolate le somme delle frazioni di tessuto mineralizzato (valutando anche il biomateriale osteointegrato come tale) per ciascun campione (osso neoformato, osteoide e biomateriale).

2.5- ANALISI MOLECOLARE DEI CAMPIONI

2.5.1- Estrazione dell'RNA da tessuto con il metodo del TRI Reagent

I tessuti sono stati conservati dopo prelievo biotico in RNA later (Quiagen) a -20 °C per preservare le molecole di acidi nucleici. La metodica di estrazione ha previsto le seguenti fasi:

1. **Lavaggio** dei campioni di tessuto dal mezzo di protezione mediante eliminazione del surnatante e centrifuga (3000 rpm per 5 minuti a 4°C).
2. **Lisi e frammentazione**, mediante risospensione in 1ml di **TRI Reagent** (Sigma-Aldrich). Questa



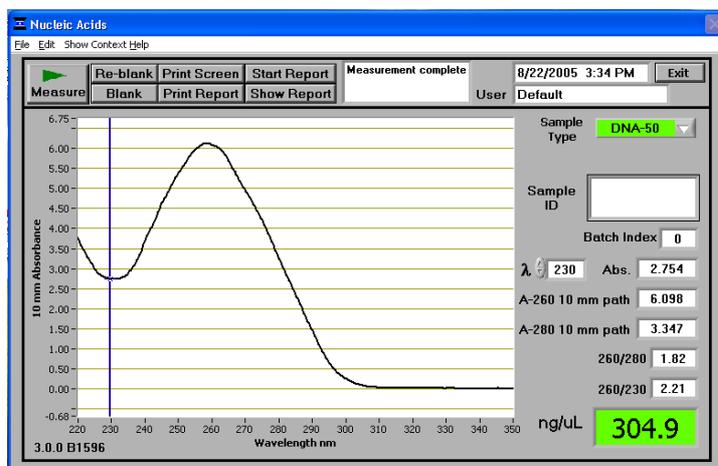
soluzione di lisi separa in 2 fasi il campione: fase trasparente composta da RNA e fase rossa composta da proteine - il disco chiaro interfase è composto da DNA); successivamente la frammentazione è stata effettuata grazie all'utilizzo di un sonicatore a lama mantenendo sempre la temperatura a 4°C grazie alla lavorazione in ghiaccio.

Figura 2.3

Fase di separazione prodotte dal Tri Reagent

3. **Separazione** dell'RNA dalle proteine evitando di non prelevare il pellet costituito da membrane cellulari.
4. **Isolazione** dell'RNA mediante l'aggiunta di cloroformio per 15 minuti a temperatura ambiente e centrifugazione a 12000 rpm per 15 minuti a 4°C;
5. **Prelievo** del surnatante incolore contenente RNA;
6. **Formazione del pellet contenente RNA** e purificazione mediante la lavorazione del surnatante incolore attraverso lavaggio con isopropanolo e centrifugazione a 12000 rpm per 10;
7. **Purificazione e fissazione dell'RNA** con l'aggiunta di etanolo al 75%;
8. **Rottura del pellet** depositatosi sul fondo e successiva centrifugazione a 14000rpm per 5 minuti a 4°C;
9. **Eliminazione** del surnatante;
10. **Evaporazione dell'etanolo** col tappo aperto sotto cappa chimica per permettere una corretta lettura allo spettrofotometro
11. **Quantificazione spettrofotometrica** al NanoDrop dopo aver disciolto il pellet in acqua bidistillata.

2.5.2- Quantificazione spettrofotometrica al NanoDrop



I campioni sono stati quantificati utilizzando il software "NanoDrop 2000", impostato sulla lettura per l'identificazione di acidi nucleici; dopo aver letto il "bianco", ovvero la soluzione in cui sono stati risospesi i campioni, essi sono stati letti uno ad uno al fine di poter conoscere la relativa concentrazione espressa in ng/μl.

Figura 2.4

Risultato dell'elaborazione con Software NanoDrop 2000

Se il campione risultava troppo concentrato si è proceduto alla diluizione con acqua sterile ed a successiva riletura. Al fine di poter controllare il grado di purezza del campione, si è osservato il range ottenuto dal rapporto di lettura a 260/280 nm, ovvero quanto il campione è contaminato da proteine (1,7-2,00) ed il rapporto a 260/230 nm indica quanto il campione sia contaminato da composti organici, cioè alcool (valori superiori a 2). I campioni da noi utilizzati avevano valori di purezza dalle proteine tra 1.7 e 2.1 ed dall'alcool per valori superiori a 2, come previsto dal protocollo.

2.5.3- Retrotrascrizione del RNA in cDNA

Il kit utilizzato per la fase di retrotrascrizione (ProtoScript® First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR system; New England BioLabs Inc.), prevedeva l'utilizzo di 1 µg di RNA per ciascun campione, ottenuto dal procedimento di estrazione. Analizzando i risultati dello spettrofotometro e mediante la nota proporzione $C1 \times V1 = C2 \times V2$, sono stati calcolati per ogni campione, i volumi necessari di RNA e dei reagenti al fine di ottenere un volume totale di reazione di 20 µl, tenendo presente i seguenti volumi fissi: 2µl di enzima, 2µl di oligonucleotidi marcati e 10 µl di master mix. I calcoli effettuati per ogni campione sono indicati con un esempio nella tabella sottostante:

campione esempio	RNA ng/µl	µl da prelevare per avere 1µg tot	dt RANDOM (oligonucleotidi marcati FAM)	H ₂ O	RX mix (master mix)	retrotrascrittasi
1	867	1.15	2	4.85	10	2

La retrotrascrizione ha previsto i seguenti steps:

1. I campioni contenenti RNA, oligonucleotidi ed acqua sterile sono stati posti nel termociclatore e incubati a 70°C per 5 minuti;
2. Successivamente sono stati aggiunti al primo volume di reazione 10 µl di master-mix e 2 µl di retrotrascrittasi per iniziare la reazione di retrotrascrizione dell'RNA in cDNA.
3. Sono stati impostati i seguenti cicli:
 - 25 °C 5 minuti
 - 42 °C 60 minuti
 - 80 °C 5 minuti
4. Dopo aver retrotrascritto i campioni, sono stati posti in ghiaccio per stoppare l'attività dell'enzima retrotrascrittasi, sono stati aggiunti 30 µl di H₂O sterile e conservati -20 °C fino alla reazione di amplificazione del cDNA mediante Real Time-PCR.

2.5.4- RT-PCR e analisi quantitativa dei marcatori valutati

La **RT-PCR** (real time-polymerase chain reaction) è denominata anche PCR quantitativa; è un metodo sensibile per poter amplificare il DNA del gene di interesse presente nel campione da analizzare, valutandone la quantità in tempo reale. La quantificazione avviene misurando i **CT** (Threshold cycle) avvenuti durante la fase esponenziale della PCR, cioè quando l'efficienza di amplificazione è influenzata minimamente dalle variabili di reazione permettendo di ottenere risultati molto accurati.

La PCR quantitativa (Gene Expression Assay, Life Technologies Italia, Monza) è stata effettuata utilizzando il metodo della sonda TaqMan per ciascun biomarkers di interesse. I campioni sono stati tutti analizzati in triplicato.

I **primer** utilizzati per l'amplificazione specifica del gene sono i seguenti:

TNF- α : fattore di necrosi tumorale alfa (Hs01113624_g1, Life Technologies Italia, Monza);

IL-6: interleuchina-6 (Hs00985639_m1, Life Technologies Italia, Monza);

RANKL: ligando del recettore attivatore del fattore nucleare kB (Hs00243522_m1, Life, Technologies Italia, Monza);

RANK: recettore attivatore del fattore nucleare kB (Hs00187192_m1, Life, Technologies Italia, Monza);

OPG: osteoprotegerina (Hs00900358_m1, Life Technologies Italia, Monza).

La reazione è stata normalizzata dapprima sul gene housekeeping GADPH (gliceraldeide 3-fosfato deidrogenasi) e successivamente sul 18s (RNA ribosomiale). Il 18s si è rivelato maggiormente stabile ed espresso in tutti i nostri campioni.

La quantificazione dei valori è stata effettuata mediante Metodo di Livak (Livak & Schmittgen 2001). I dati di CT ottenuti sono stati tutti normalizzati sui CT del gene housekeeping; la formula utilizzata per ottenere i dati da analizzare è stata la seguente:

Ratio normalizzato di espressione = $2^{-\Delta\Delta CT}$,

dove il ΔCT = CT del gene di interesse di ogni campione (OA, GS, B) - CT del gene housekeeping entro ciascun campione,

e il $\Delta\Delta CT$ = ΔCT del gruppo (GS o B) - ΔCT del gruppo (OA)

Il gruppo OA è stato scelto come gruppo paragone per ottenere il fold increase or decrease del gene target valutato.

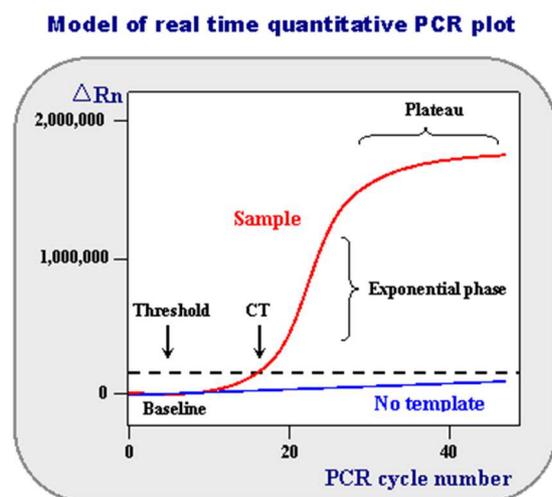


Figura 2.5

Curva del processo di amplificazione della RT-PCR

Inoltre è stato valutato il ratio RANKL/OPG degli incrementi calcolati rispetto al gruppo OA considerato come baseline fisiologico di tutti i processi di guarigione attivi negli altri due gruppi, per valutare la maggior propensione dell'espressione genica in senso osteoclastico od osteoblastico.

2.5- ANALISI STATISTICA

L'analisi statistica si compone di due parti:

- Analisi descrittiva

Per ciascun gruppo sperimentale sono state calcolate la media e deviazione standard delle percentuali di marcatura per ogni marcatore e per ciascuna componente tessutale nell'analisi istomorfometrica.

Dei dati ottenuti dall'analisi delle frazioni di volume mediante stereologia sono state calcolate la media e la deviazione standard dei gruppi GS e B per ogni tipologia di tessuto.

Per la parte molecolare è stata calcolata la media e deviazione standard dei Δ CT ottenuti dall'analisi in RT-PCR per ogni biomarker esaminato, sui quali si è lavorato per ottenere il valori di espressione genica.

Inoltre sui valori di "Expression Fold" è stato calcolato il rapporto RANKL/OPG che è considerato un indice immediato del processo di attività osteoclastica (Grimaud et al. 2003).

- Analisi descrittiva

È stata effettuata un'analisi della varianza non parametrica (Kruskal-Wallis), che ha permesso di trovare differenze tra i tre gruppi per un valore di $p \leq 0,05$; riscontrate le eventuali significatività, i campioni sono stati confrontati a due a due mediante il post hoc test di Wilcoxon (test dei ranghi col segno per confronto di gruppi non appaiati), ed è stata ricercata un'eventuale significatività tra il gruppo OA e GS, OA e B ed GS e B, per ciascun fattore preso in esame (per un valore di $p < 0,05/3$) sia per l'analisi immunohistochimica che molecolare.

Le analisi sono state condotte tramite programma Kyplot (Kienlab inc.).

3- RISULTATI

3.1- CAMPIONE

La popolazione inclusa nel presente studio è costituita da 36 soggetti, di cui 17 di sesso maschile e 19 di sesso femminile. Come stabilito dal protocollo di ricerca iniziale, tutti gli individui, oltre a soddisfare le caratteristiche dei criteri di inclusione, avevano un'età non inferiore ai 18 anni; la media delle loro età è risultata di 51,7 anni, con valore minimo di 23 anni e massimo di 84 anni.

La suddivisione dei gruppi si è così ripartita:

-gruppo OA, dei 15 arruolati per ciascun gruppo, 14 sono stati considerati per il progetto di ricerca, in quanto i prelievi effettuati sono risultati idonei al lavoro;

-gruppo GS, dei 15 arruolati per ciascun gruppo, 10 sono stati considerati per il progetto di ricerca, in quanto i prelievi effettuati sono risultati idonei al lavoro;

-gruppo B, dei 15 arruolati per ciascun gruppo, 12 sono stati considerati per il progetto di ricerca, in quanto i prelievi effettuati sono risultati idonei al lavoro;

3.2- PROCEDURA CHIRURGICA

Tutti i pazienti del gruppo OA non hanno avuto problemi durante la procedura di avulsione dentale; anche i pazienti del gruppo GS e B non hanno avuto complicanze né durante il periodo di guarigione né durante la fase di posizionamento dell'impianto dentale.

3.3- ANALISI ISTOLOGICA

3.3.1- Analisi qualitativa

L'analisi qualitativa effettuata mediante l'osservazione dei campioni di osso decalcificati e successivamente colorati con Ematossilina di Carazzi ed Eosina, ha permesso di osservare che i campioni di tutti e tre i gruppi sperimentali si presentavano sani, senza la presenza di infiltrati di tipo infiammatorio ed idonei all'analisi morfologica.

3.3.2- Analisi istologica morfologica semi-quantitativa:

Valutazione percentuale della marcatura mediante analisi di immagine

L'analisi istologica semi-quantitativa è stata condotta tramite valutazione colorimetrica della percentuale di marcatura immunoistochimica presente nei preparati istologici di ogni paziente del gruppo OA, GS e B.

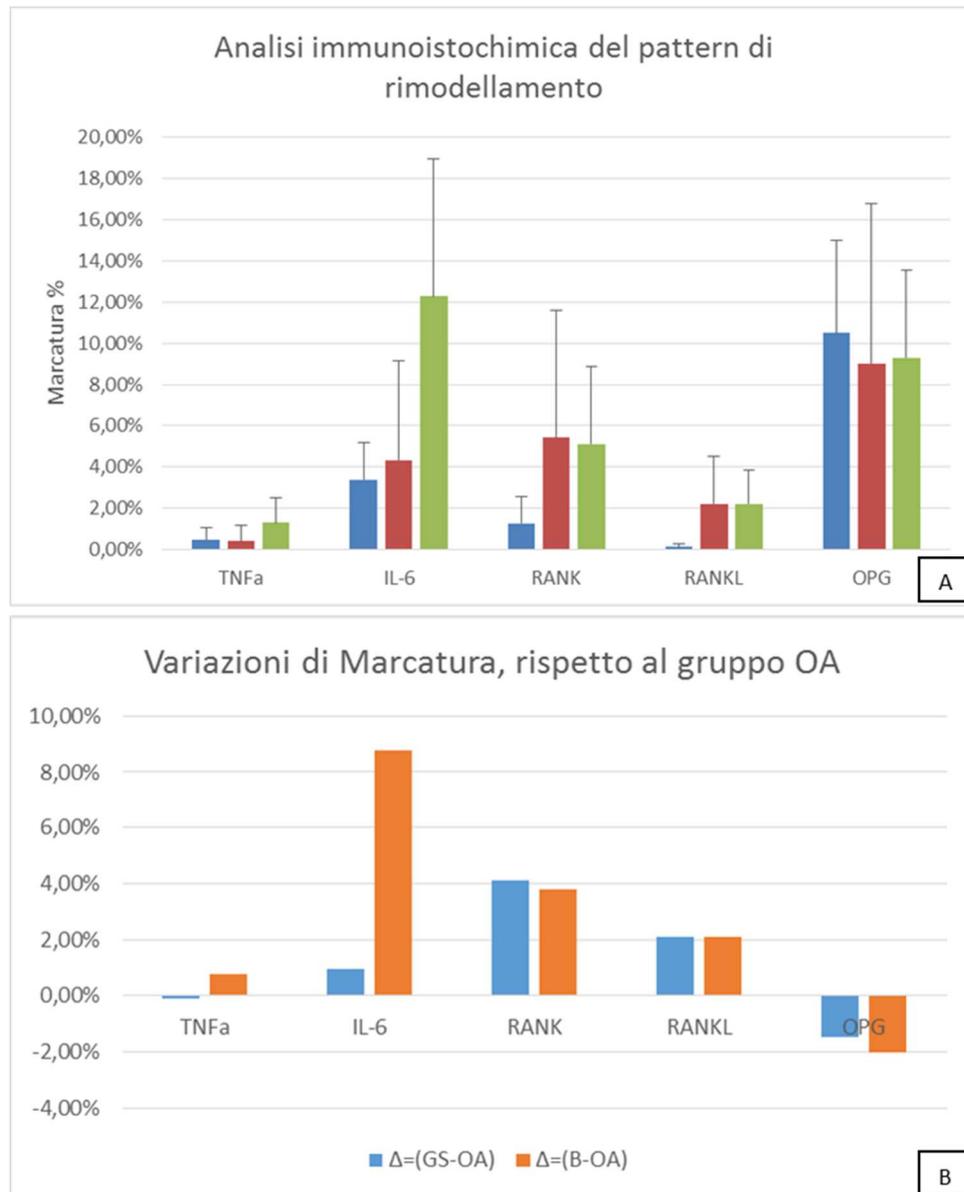


Figura 3.1

A: Il grafico rappresenta la media delle percentuali di marcatura, per ogni marker valutato.

B: Il grafico rappresenta le variazioni di marcatura rispetto al gruppo OA. È stato calcolato il delta tra i gruppi in fase di guarigione e il gruppo OA.

I tre gruppi sono stati confrontati mediante test di Kruskal-Wallis che ha mostrato i seguenti risultati:

- ✓ TNF- α \rightarrow $p \leq 0,05$
- ✓ IL-6 \rightarrow $p \leq 0,001$

- ✓ RANK → $p \leq 0,01$
- ✓ RANKL → $p \leq 0,001$
- ✓ OPG → N.S.

Successivamente è stato effettuato il test post hoc non parametrico di Wilcoxon della somma dei ranghi per campioni indipendenti, che ha mostrato una differenza statisticamente significativa per ($p \leq 0,05/3$), solo tra il gruppo OA e B per i biomarker: IL-6 ($p \leq 0,001$), RANK ($p \leq 0,01$) e RANKL ($p \leq 0,001$).

I gruppi confrontati GS e B hanno mostrato una differenza statisticamente significativa per IL-6 ($p \leq 0,01$), mostrando un andamento molto simile tra di loro per RANK, RANKL, OPG.

3.3.3- Mappatura dell'espressione dei biomarker

TNF- α - osso alveolare (OA)

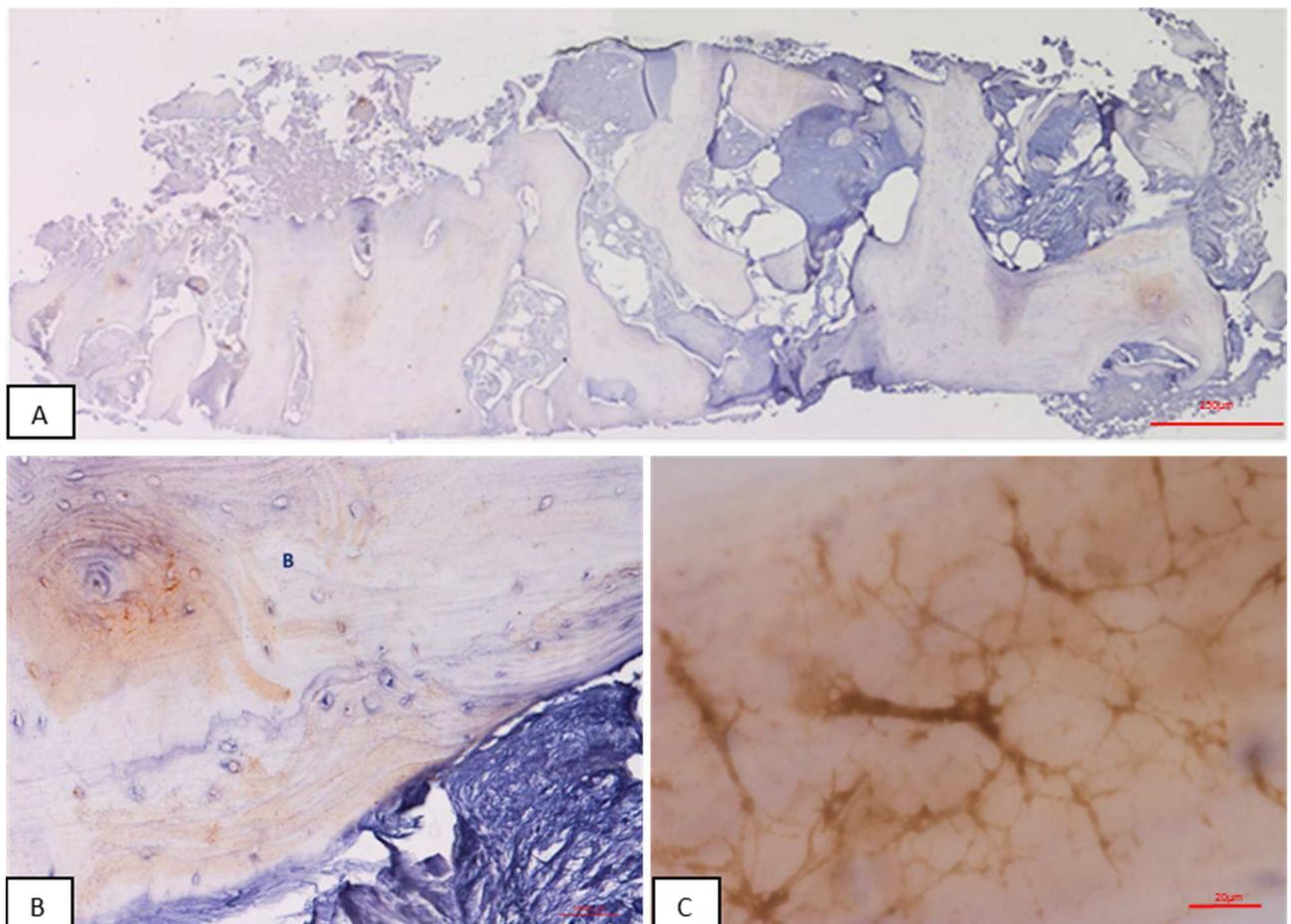


Figura 3.2

A: L'immagine mostra una panoramica della mappatura nella biopsia; colorazione immunohistochimica anti TNF- α , ingrandimento originale 5x (barra 250 μ m).

B: Particolare della marcatura presente nella parte mineralizzata del tessuto osseo; colorazione immunohistochimica anti TNF- α , ingrandimento totale 400x (barra 30 μ m).

C: Particolare della marcatura presente nei canalicoli osteocitari; colorazione immunohistochimica anti TNF- α , ingrandimento totale 600x (barra 20 μ m).

All'osservazione la marcatura non risulta particolarmente spiccata (Fig. 3.2A) in quanto i campioni sono stati prelevati da soggetti privi di patologie infiammatorie in corso (Kwan et al. 2004). Essa è poco presente e rilevabile in maniera puntiforme nel tessuto osteoide, nel tessuto osseo nelle aree di rimodellamento (Fig 3.2B). La marcatura presente a livello della componente ossea matura è prevalentemente localizzata nelle lacune e nei canalicoli osteocitari (Fig. 3.2C).

TNF- α - guarigione spontanea (GS)

Come nel gruppo T0, la marcatura non risulta molto evidente; si presenta prevalentemente negli spazi midollari e nelle aree di matrice osteoide (Fig. 3.3A,B).

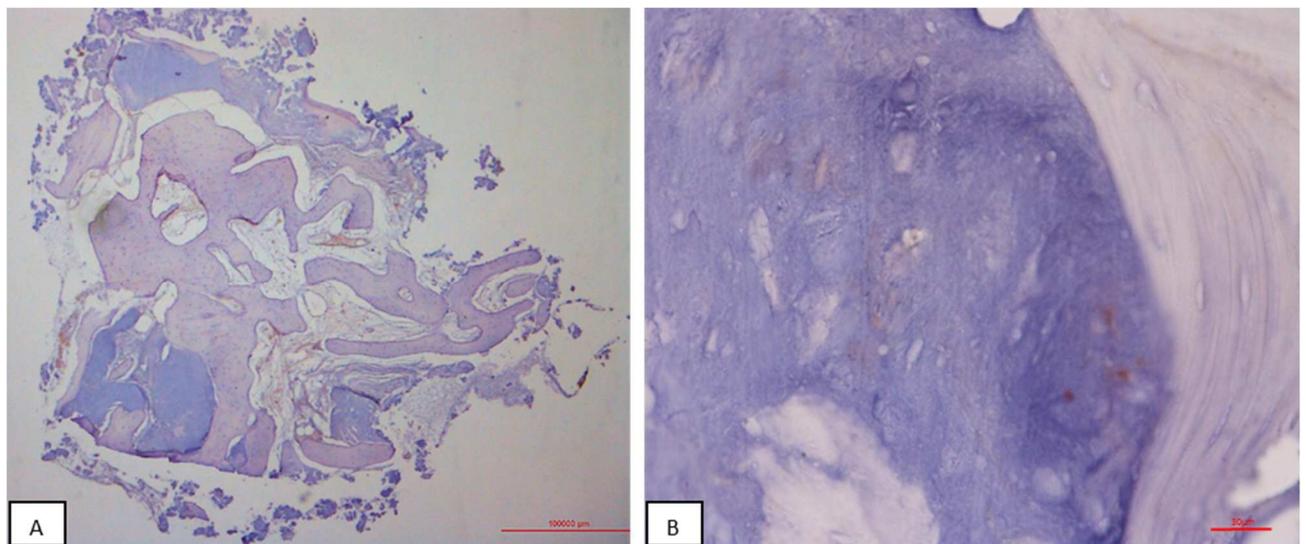


Figura 3.3

A: L'immagine mostra una panoramica della mappatura nella biopsia; colorazione immunohistochimica anti TNF- α , ingrandimento originale 20x (barra 100 μ m);

B: Particolare della marcatura che si presenta puntiforme e rilevabile nella matrice osteoide; colorazione immunohistochimica anti TNF- α , ingrandimento totale 400x (barra 30 μ m).

TNF- α - biomateriale (B)

Si mostra una marcatura più accentuata rispetto ai gruppi OA e GS (ma pur sempre limitata), non solo nei canalicoli della matrice altamente mineralizzata ma anche in quella osteoide, senza apparente localizzazione caratteristica (Fig. 3.4 A)

A maggior ingrandimento, si nota che la marcatura è rilevabile nel tessuto connettivo degli spazi che circondano il biomateriale e il tessuto osseo, ovvero zone dove i processi di rimodellamento sono maggiormente attivi (Fig. 3.4 B,C).

In tutti i casi si tratta comunque di una marcatura essenzialmente extracellulare, infatti, TNF- α è un fattore rilasciato nelle matrici extracellulari e che, attraverso queste, raggiunge i suoi numerosi target cellulari (Hollinger et al. 2011).

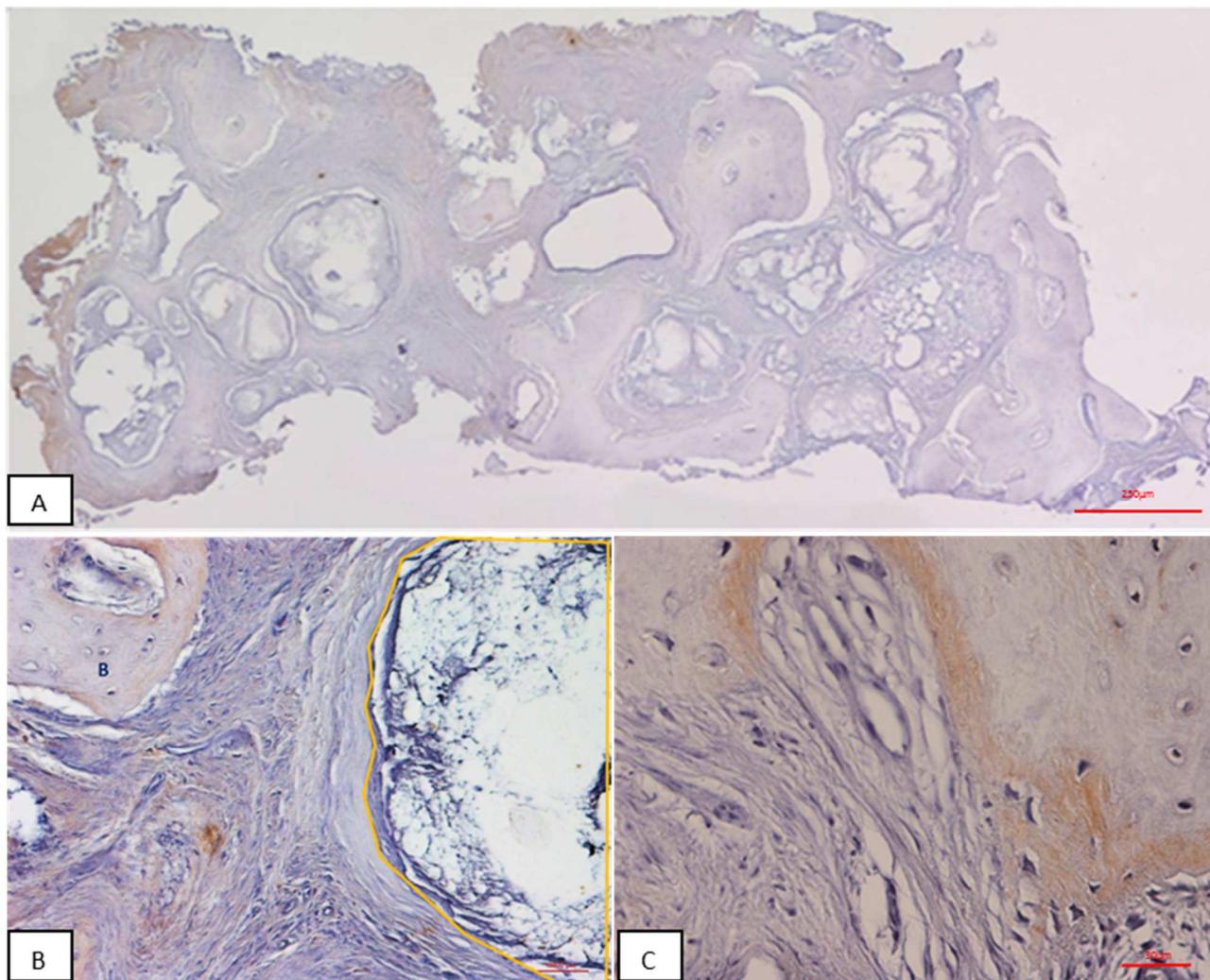


Figura 3.4

A: L'immagine mostra una panoramica della mappatura nella biopsia; colorazione immunohistochimica anti TNF- α , ingrandimento originale 5x (barra 250 (barra 250 μ m)).

B: TNF- α risulta moderatamente espresso nelle aree di matrice in fase di mineralizzazione circostanti il biomateriale (area delimitata da perimetro in giallo) e l'osso neoformato; colorazione immunohistochimica anti TNF- α ingrandimento totale 200x(barra 100 μ m).

C: In quest'immagine, la marcatura caratterizza un area di tessuto osseo in fase di rimodellamento; colorazione immunohistochimica anti TNF- α , ingrandimento totale 400x (barra 30 μ m).

IL-6 - osso alveolare (OA)

La marcatura si presenta diffusa nelle aree in cui è presente tessuto osteoide (densamente colorato di blu), negli spazi midollari e a ridosso delle aree di tessuto osseo sottoposte a rimodellamento (Fig. 3.5).

Inoltre, vengono marcati vari tipi cellulari (presumibilmente osteociti, osteoblasti, osteoclasti, monociti e cellule endoteliali).

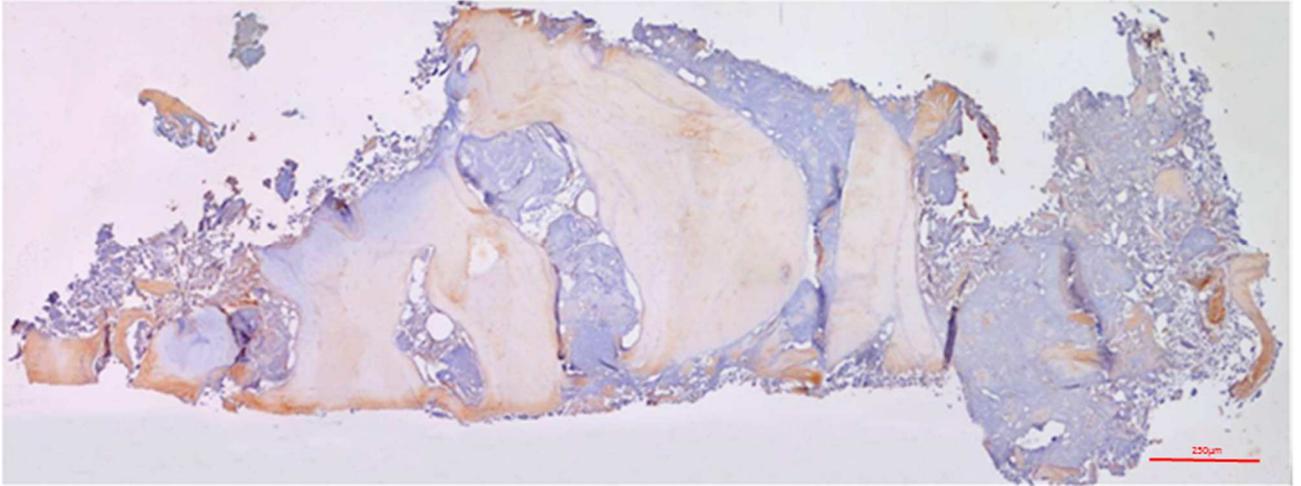


Figura 3.5

L'immagine mostra una panoramica della mappatura nella biopsia; colorazione immunohistochimica anti IL-6, ingrandimento originale 5x (barra 250µm).

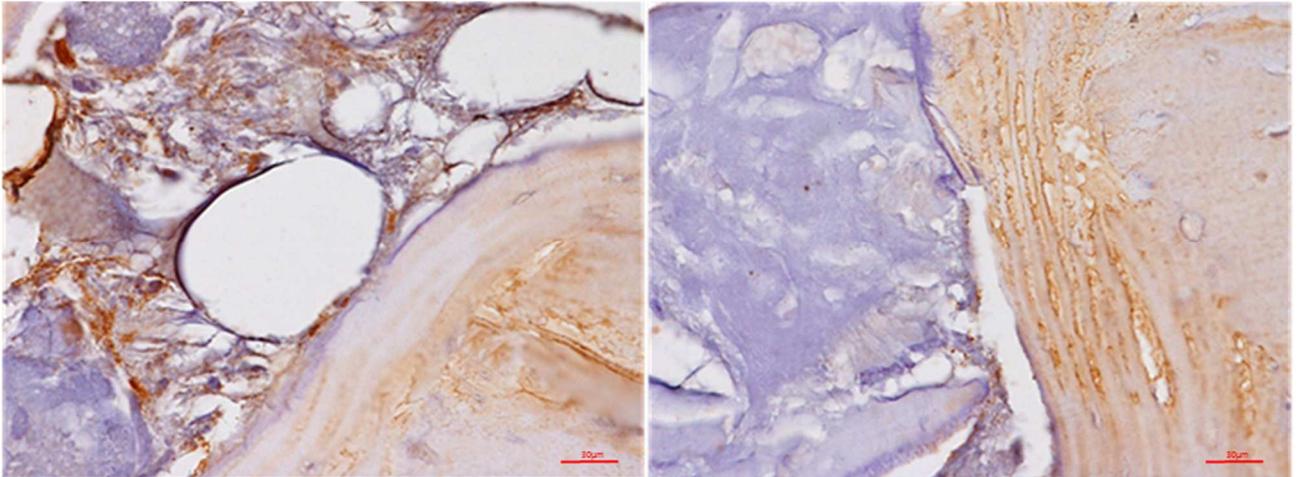


Figura 3.6

La marcatura si presenta diffusa nelle aree in cui è presente tessuto osteoide (densamente colorato di blu), negli spazi midollari ed a ridosso delle aree di tessuto osseo sottoposte a rimodellamento; colorazione immunohistochimica anti IL-6, ingrandimento totale 400x.

IL-6 – guarigione spontanea (GS)

La marcatura presenta caratteristiche molto simili al gruppo OA, infatti è possibile osservare la sua diffusione negli spazi midollari, in prossimità delle aree di rimodellamento, in modo anche puntiforme sulle cellule endoteliali (figura 3.7 D) e cellule caratteristiche del tessuto osseo.

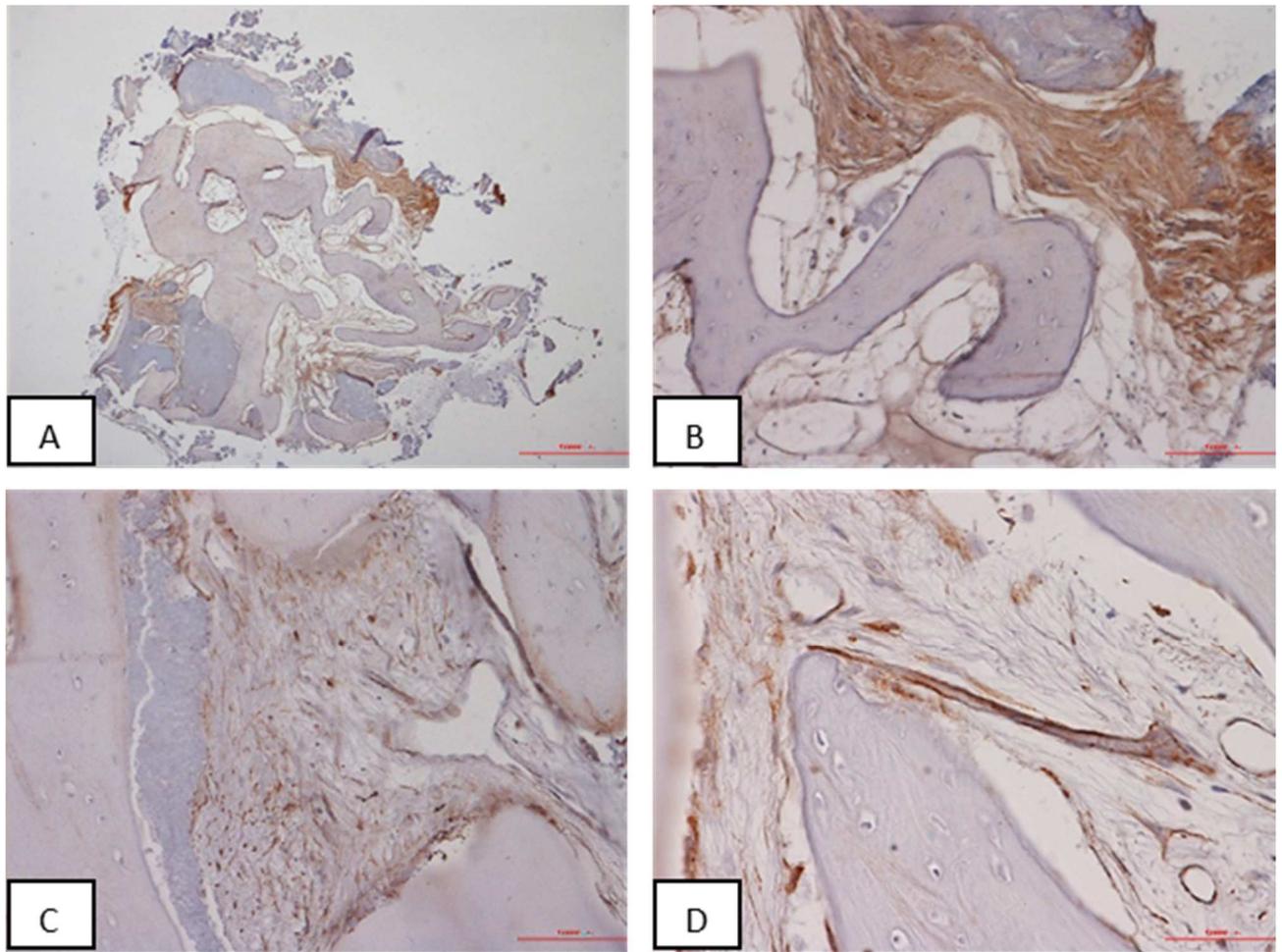


Figura 3.6:

A: L'immagine mostra una panoramica della mappatura nella biopsia; colorazione immunohistochimica anti IL-6, ingrandimento totale 20x (barra 100 μ m).

B: La marcatura caratterizza in modo consistente parte degli spazi midollari; colorazione immunohistochimica anti IL-6, ingrandimento totale 200x (barra 100 μ m).

C: Particolare della marcatura puntiforme su cellule della porzione midollare; colorazione immunohistochimica anti IL-6, ingrandimento totale 200x (barra 100 μ m).

D: Particolare che mostra come IL-6 sia particolarmente evidente nella marcatura di cellule endoteliali di vasi sanguigni (in sezione sia trasversale che longitudinale); colorazione immunohistochimica anti IL-6, ingrandimento totale 400x (barra 30 μ m).

IL-6 – biomateriale (B)

La quota di marcatura è evidentemente maggiore rispetto ai gruppi OA e GS (Fig.3.7).

La marcatura si presenta diffusa nelle aree in cui è presente tessuto connettivo degli spazi midollari, a ridosso delle aree di tessuto osseo e di biomateriale sottoposte a rimodellamento (Fig. 3.8).

Ad alto ingrandimento è ancora più apprezzabile il legame della citochina alla superficie delle cellule osteogeniche, endoteliali ed infiammatorie presenti nel sito di prelievo, sia nella compagine connettivale che sul margine osseo in fase di rimodellamento (Fig. 3.8, 3.9).

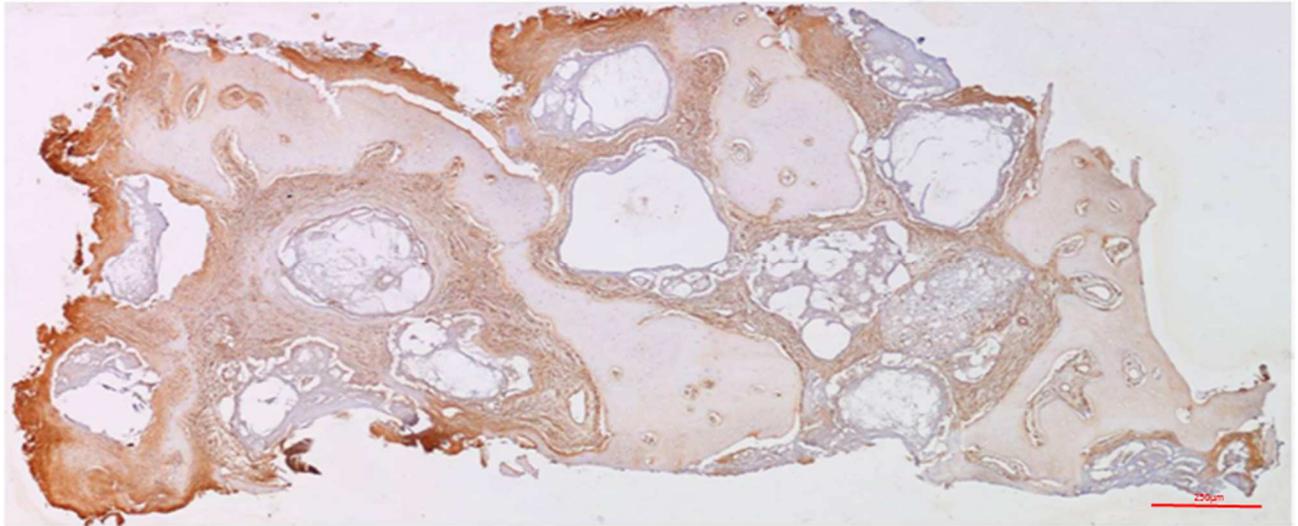


Figura 3.7

L'immagine mostra una panoramica della mappatura nella biopsia; colorazione immunoistochimica anti IL-6, ingrandimento originale 5x (barra 250µm).

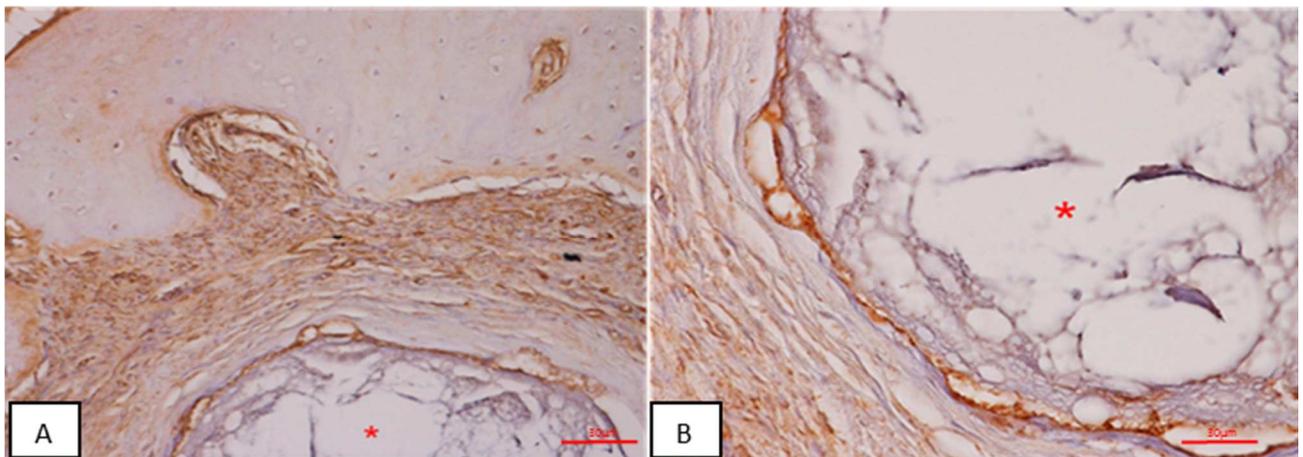


Figura 3.8

A: La colorazione ha messo in evidenza la massiva presenza di IL-6 negli spazi midollari; colorazione immunoistochimica anti IL-6, ingrandimento totale 400x

B: La marcatura è particolarmente evidente nelle aree circostanti il biomateriale (asterisco rosso); una linea evidente (freccia azzurra) mostra la presenza della citochina nelle aree di interfaccia biomateriale matrice ossea neoformata; colorazione immunoistochimica anti IL-6, ingrandimento totale 400x

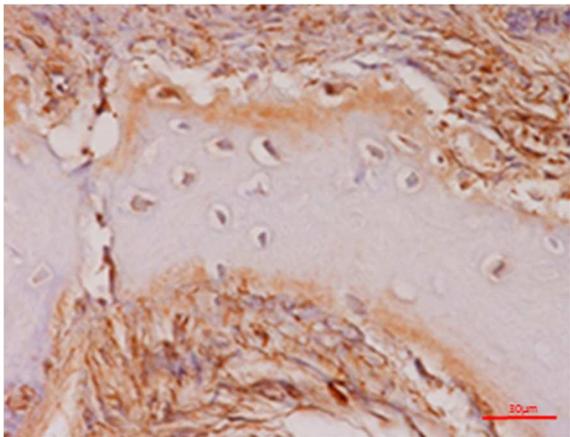


Figura 3.9

La colorazione ha messo in evidenza il margine della trabecola ossea in fase attiva di rimodellamento; colorazione immunoistochimica anti IL-6, ingrandimento totale 400x (barra 30µm).

RANK - osso alveolare (OA)

La marcatura è rilevabile in tracce nel tessuto connettivo e nel tessuto osseo nelle aree di rimodellamento (Fig. 3.10) data la sua localizzazione sulla superficie delle cellule pre-osteoclastiche e sugli osteoclasti maturi (Hollinger et al. 2011).

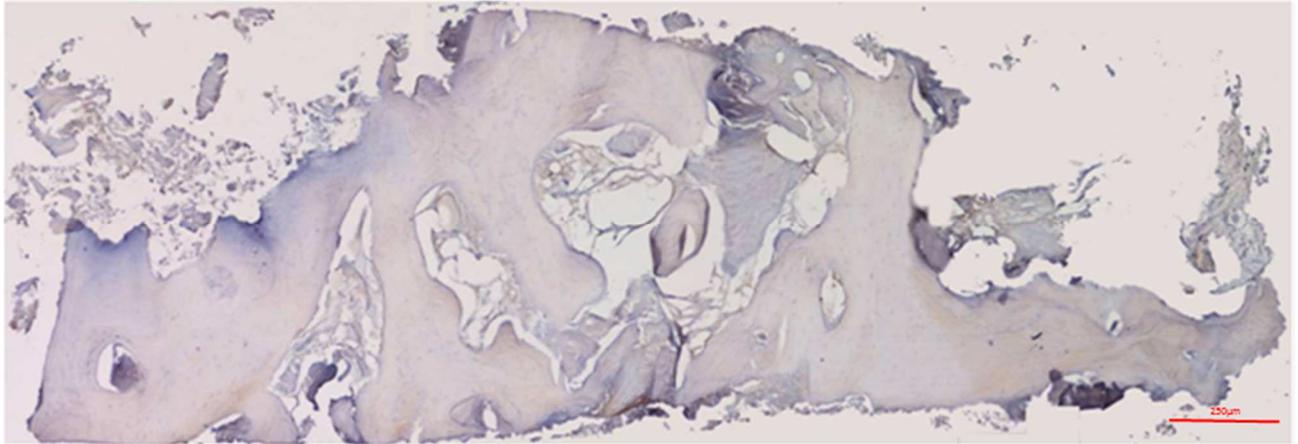


Figura 3.10

L'immagine mostra una panoramica della mappatura nella biopsia; colorazione immunohistochimica anti RANK, ingrandimento originale 5x (barra 250µm).

La marcatura appare essenzialmente extracellulare e localizzata esternamente ad alcune cellule presenti nel tessuto connettivo e midollare (Fig. 3.11B). Inoltre è presente nella porzione di tessuto mineralizzato come la matrice osteoide e woven bone (Fig. 3.11A).

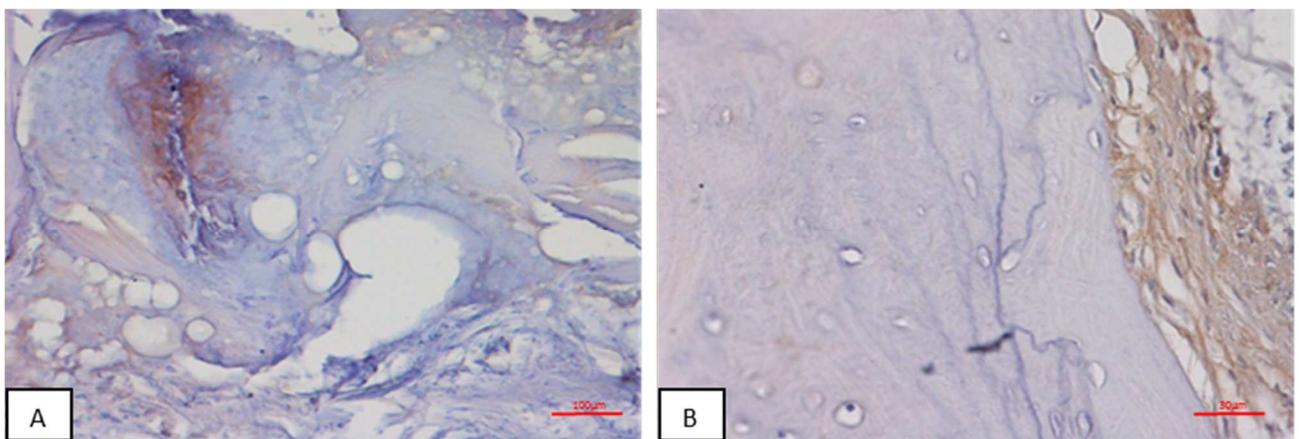


Figura 3.11

A: Particolare della marcatura rilevabile nelle aree di rimodellamento osseo; colorazione immunohistochimica anti RANK, ingrandimento originale 200x (barra 100µm).

B: Particolare della marcatura rilevabile negli spazi midollari; colorazione immunohistochimica anti RANK, ingrandimento originale 400x (barra 30µm).

RANK – guarigione spontanea (GS)

La marcatura è rilevabile è lievemente più marcata rispetto al gruppo OA e presenta le medesime caratteristiche.

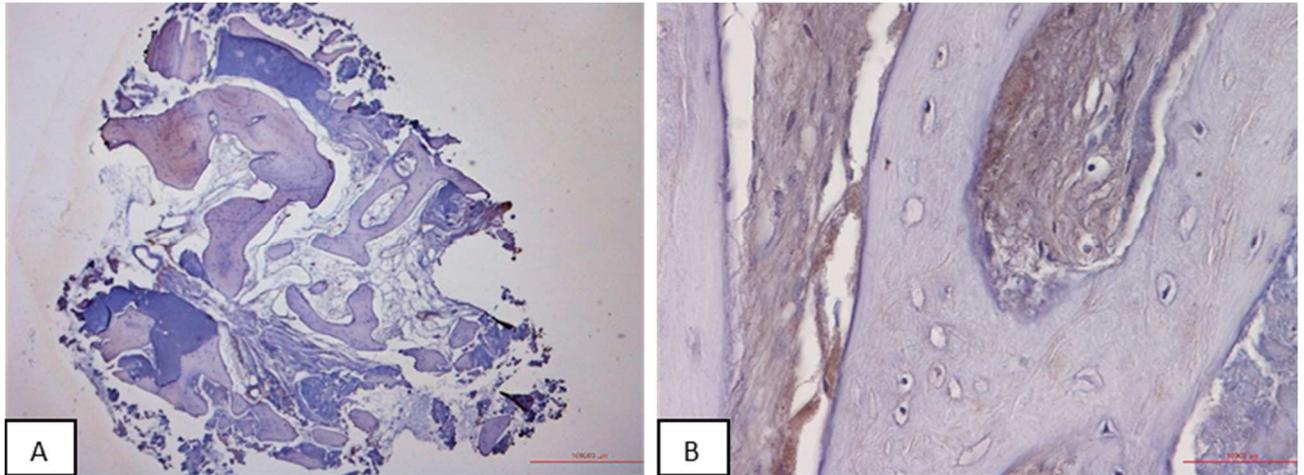


Figura 3.12

A: L'immagine mostra una panoramica della mappatura nella biopsia; colorazione immunocistochimica anti RANK, ingrandimento originale 5x (barra 250 μ m);

B: Particolare della marcatura che caratterizza presumibilmente gli osteoclasti presenti negli spazi midollari circostanti il tessuto osseo; colorazione immunocistochimica anti RANK, ingrandimento originale 400x (barra 30 μ m).

RANK - biomateriale (B)

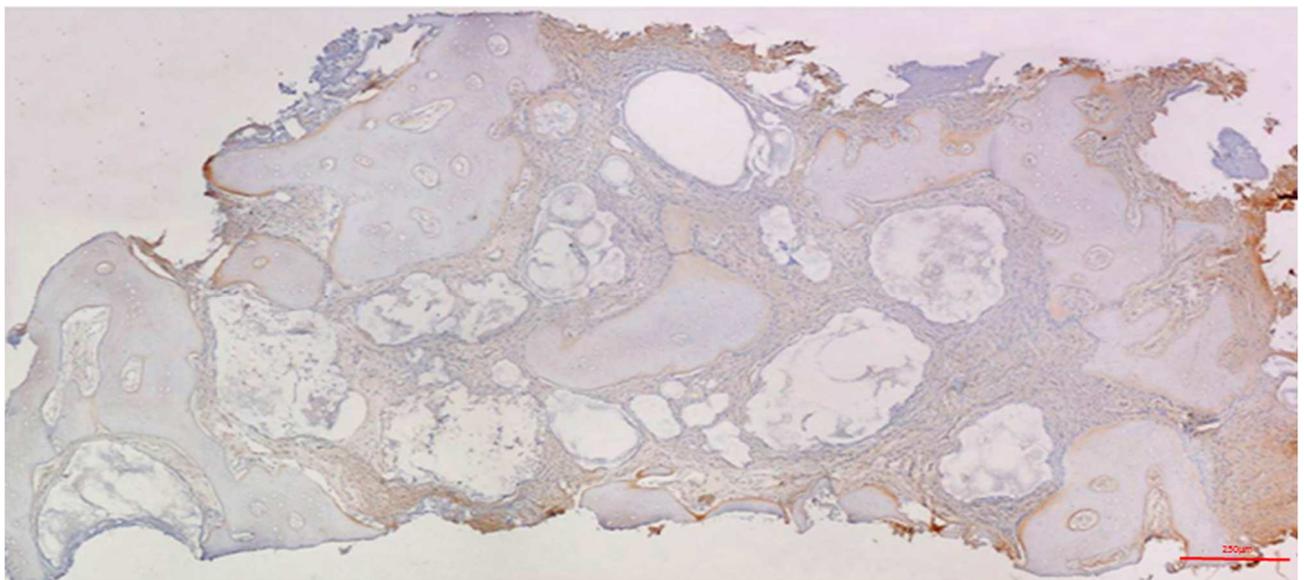


Figura 3.13

L'immagine mostra una panoramica della mappatura nella biopsia; colorazione immunocistochimica anti RANK, ingrandimento originale 5x.

La marcatura è rilevabile maggiormente rispetto ai gruppi OA e GS (Fig. 3.13), sempre nel tessuto connettivo che in questo caso ingloba i granuli di biomateriale, nella matrice osteoide (Fig. 3.14D) e sui contorni del tessuto osseo, in particolare nelle aree in fase di rimodellamento (Fig. 3.14C).

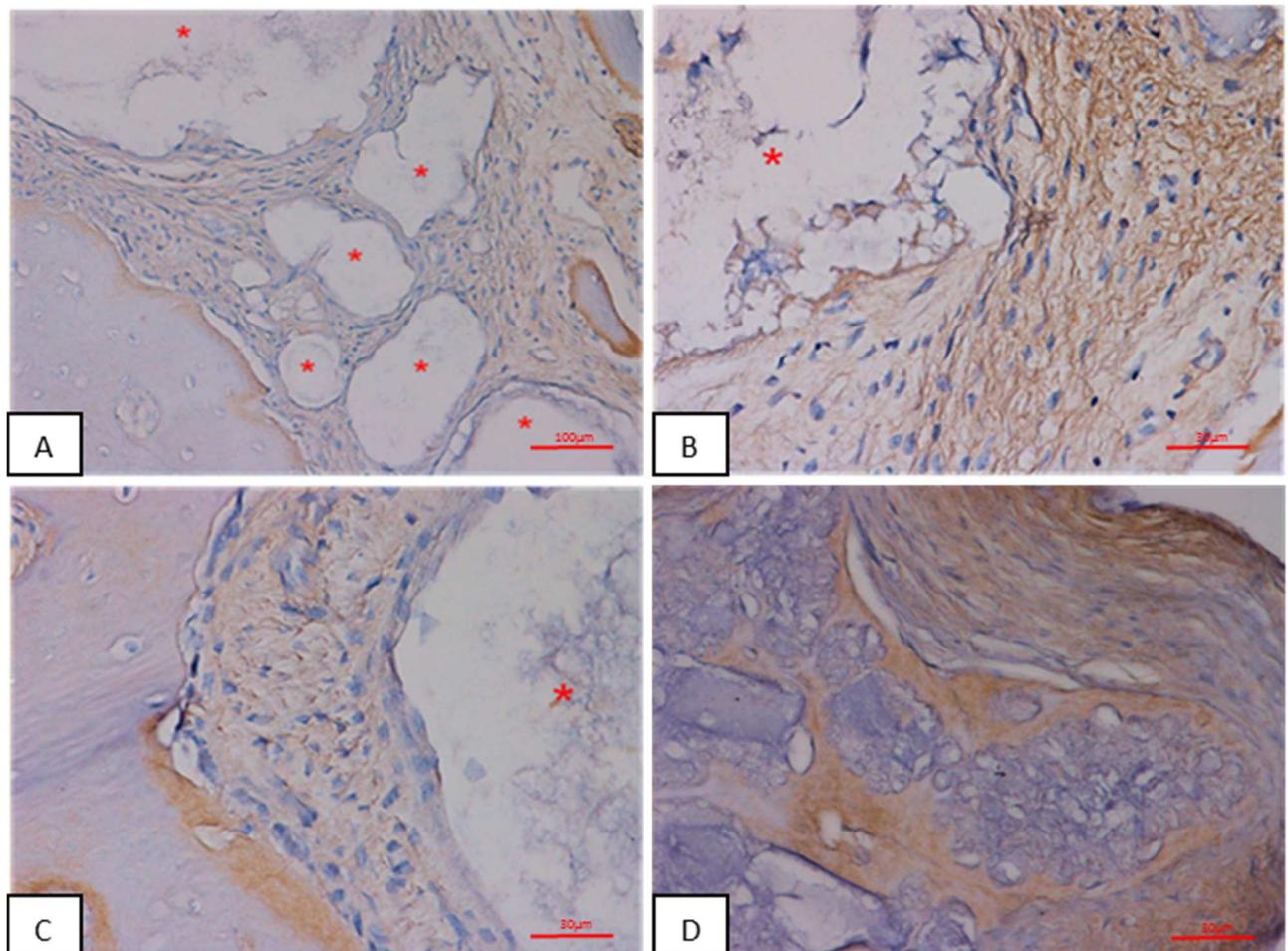


Figura 3.14

A-D: La marcatura è ben evidente negli spazi midollari (A-C), nella matrice osteoide (D), sui margini delle trabecole ossee (A-C) ed in prossimità del biomateriale (A-C); colorazione immunohistochimica anti-RANK; ingrandimento totale 200x (A) (barra 100µm), 400x (B-D) (barra 30µm).

La modalità di distribuzione è fondamentalmente la stessa che si osserva negli altri due gruppi. Data la presenza dei granuli di biomateriale (asterisco rosso) (Fig. 3.14 A,B) e la fase di rimodellamento in atto le superfici ossee circostanti si mostrano interessate da fenomeni di riassorbimento osteoclastico.

[RANKL – osso alveolare \(OA\)](#)

Si osserva una marcatura quasi assente, sotto forma di piccoli spot isolati, molto lievi, presenti solo in pochi campioni. Si tratta di una situazione compatibile nell'osso alveolare in situazioni fisiologiche, in quanto RANKL viene prodotto sulla superficie delle cellule pre-osteoblastiche sotto stimolazione di

svariati fattori come PTH – paratormone, TNF- α ed IL-6. Ad ingrandimento totale 20x non è osservabile alcuna apparente marcatura (Fig. 3.15).

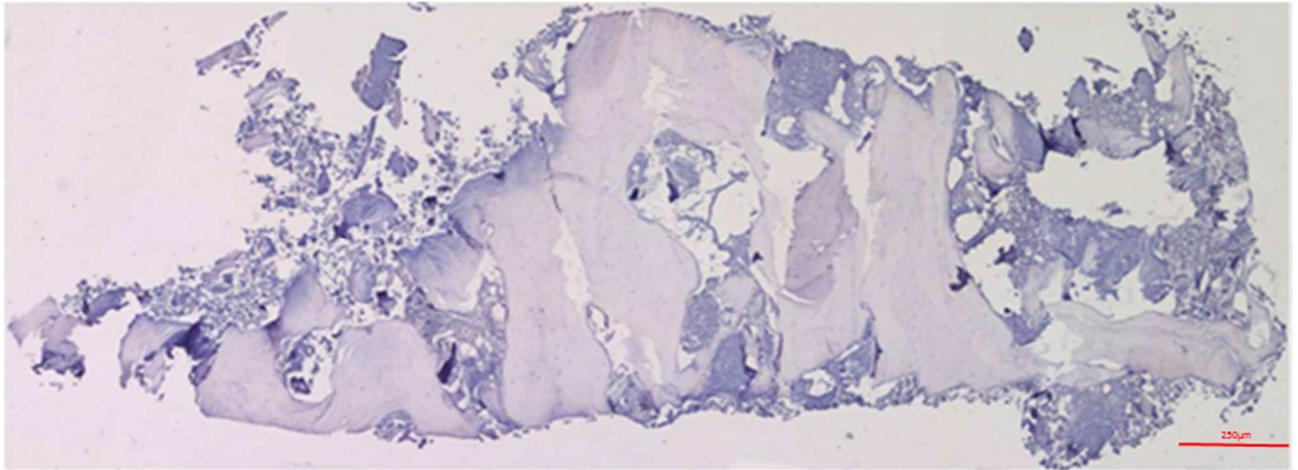


Figura 3.15

L'immagine mostra una panoramica della mappatura nella biopsia; colorazione immunocistochimica anti RANKL, ingrandimento originale 5x (barra 250 μ m).

Le spot rilevate sono probabilmente localizzate su cellule pre-osteoblastiche che esprimono RANKL in maniera basale, attivate da un processo di rimodellamento in corso fisiologicamente (Fig. 3.16 A,B).

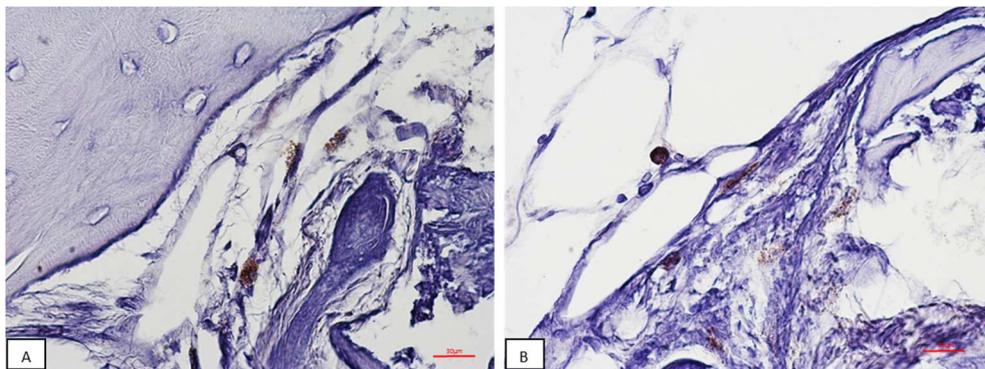


Figura 3.16

A, B: La marcatura si presenta in percentuali minime e rilevabili in prossimità delle cellule presenti nel tessuto connettivo degli spazi circostanti il tessuto osseo; colorazione immunocistochimica anti RANKL, ingrandimento totale 400x (barra 30 μ m).

RANKL – guarigione spontanea (GS)

La marcatura presenta caratteristiche topografiche simili a quelle riscontrate nel gruppo OA (Fig. 3.17 A,B).

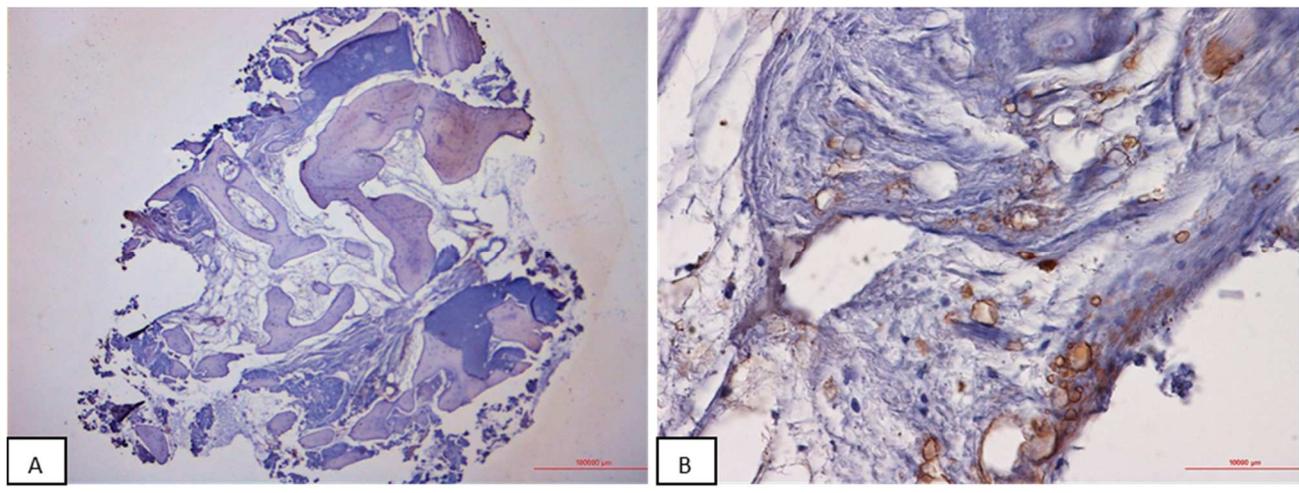


Figura 3.17

A: L'immagine mostra una panoramica della mappatura nella biopsia; colorazione immunohistochimica anti RANKL, ingrandimento originale 5x (barra 250µm).

B: Particolare della marcatura che si presenta a spot nella porzione di matrice presente negli spazi midollari a ridosso nel tessuto osseo in fase di rimodellamento, ingrandimento totale 400x (barra 30µm).

RANKL- biomateriale (B)

La marcatura si presenta in percentuali lievemente maggiori, rispetto ai gruppi OA e GS, e rilevabile nel tessuto connettivo degli spazi circostanti il biomateriale e il tessuto osseo, soprattutto nei siti in via di mineralizzazione come nella matrice osteoide e nel woven bone.

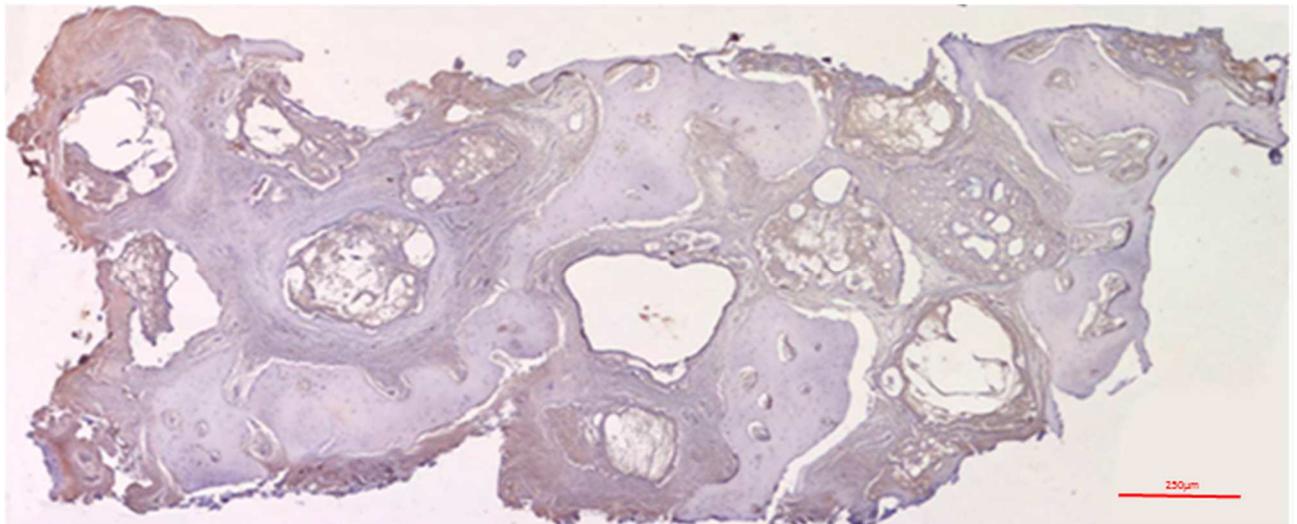


Figura 3.18

L'immagine mostra una panoramica della mappatura nella biopsia; colorazione immunohistochimica anti RANKL, ingrandimento originale 5x (barra 250µm).

La marcatura risulta più diffusa a livello extracellulare (Fig. 3.19A,C) colonizzando anche parte del biomateriale (Fig. 3.19B). Nella figura 3.19D sono ben evidenti grosse cellule marcate in prossimità di osso neoformato.

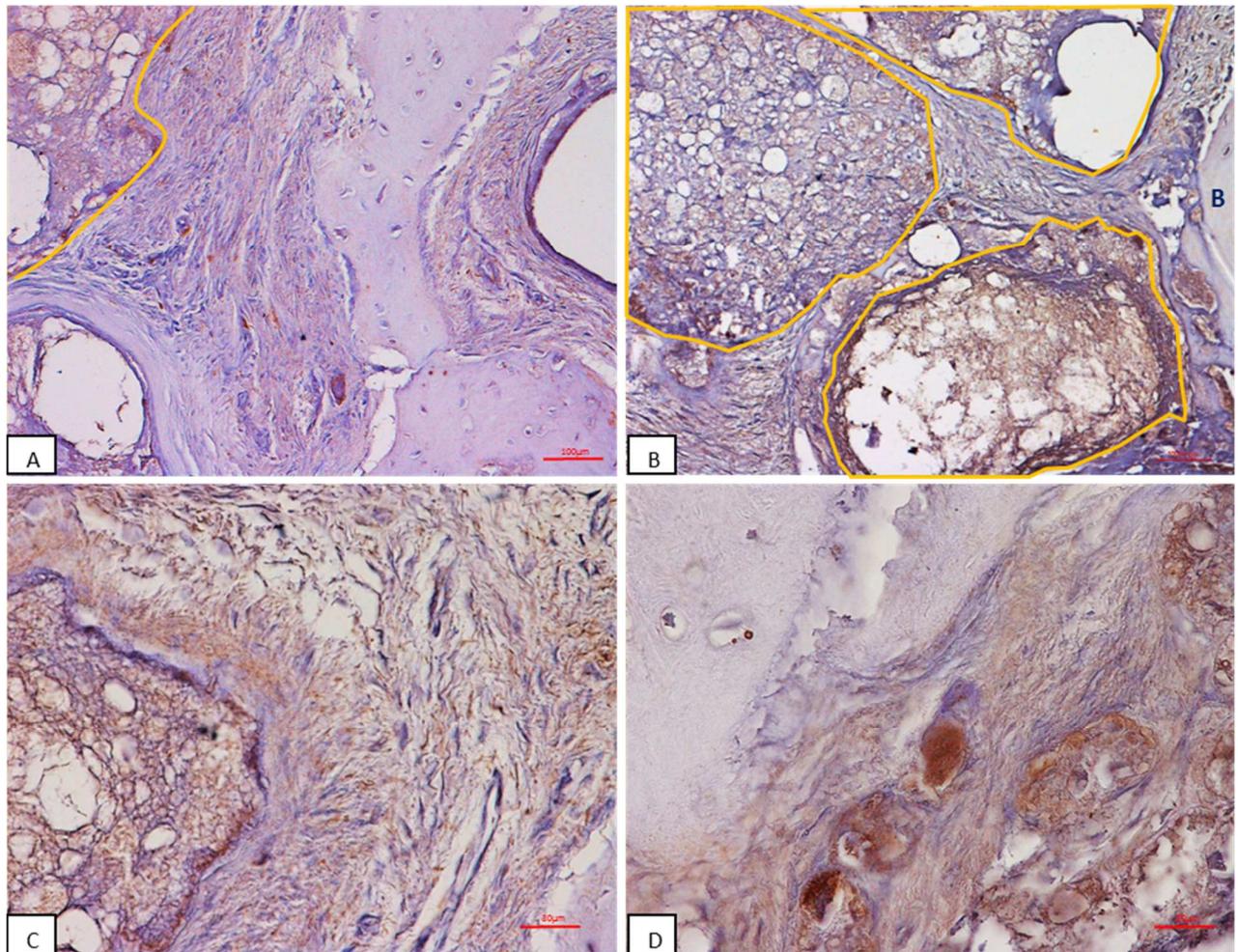


Figura 3.19

A, B: Queste immagini mostrano come i blocchetti di biomateriale (perimetrati in giallo) risultino essere caratterizzati da marcatura (in marrone) sia nelle aree di matrice circostanti che ai bordi del materiale; colorazione immunostochimica anti-RANKL, ingrandimento totale 200x (barra 100 μ m);

C, D: La marcatura si presenta in percentuali minime e rilevabile nel tessuto connettivo degli spazi circostanti il biomateriale ed il tessuto osseo e matrice osteoide in fase di mineralizzazione e organizzazione strutturale; ingrandimento totale 400x (barra 30 μ m).

OPG- osso alveolare (OA)

Osteoprotegerina marcata si presenta distribuita in modo diffuso ed evidente negli spazi midollari (Fig. 3.20A), nella matrice osteoide e nel tessuto osseo mineralizzato (Fig. 3.20A) La marcatura è visibile al limitare dei canali di Havers e sui margini delle lamelle ossee in fase attiva di rimodellamento.

La marcatura inoltre caratterizza la matrice osteoide (Fig. 3.20 C) e piccoli spazi che evolveranno nelle future lacune osteocitarie.

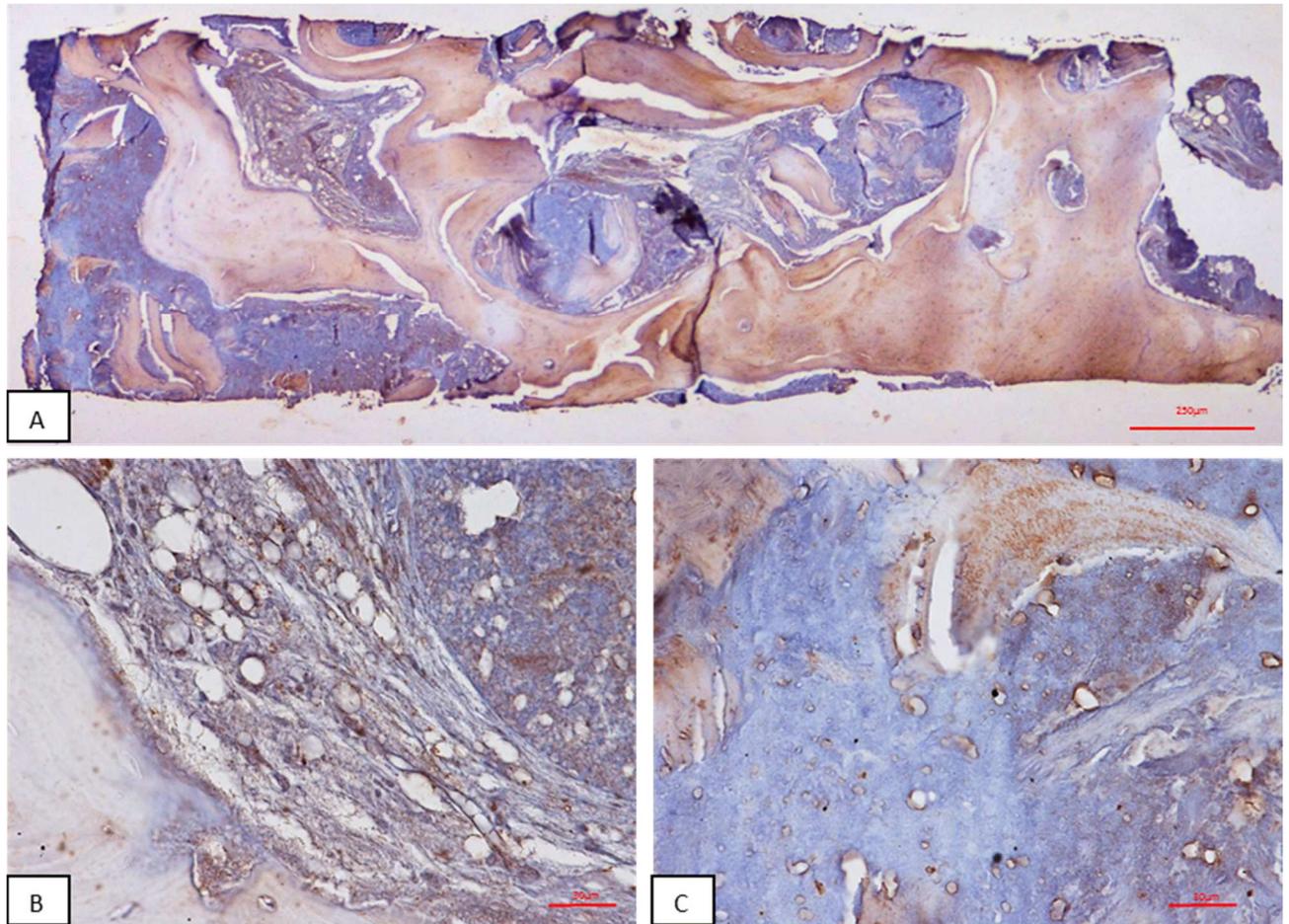


Figura 3.20

A: L'immagine mostra una panoramica della mappatura nella biopsia; colorazione immunohistochimica anti OPG, ingrandimento originale 5x (barra 250μm);

B: La marcatura si presenta sparsa e puntiforme nel tessuto connettivo caratterizzante gli spazi midollari e la matrice in fase di mineralizzazione; ingrandimento totale 400x (barra 30μm);

C: L'espressione di OPG nella matrice osteoide e nelle pre-lacune osteocitarie in fase di formazione; colorazione immunohistochimica anti OPG, ingrandimento totale 400x (barra 30μm).

OPG- guarigione spontanea (GS)

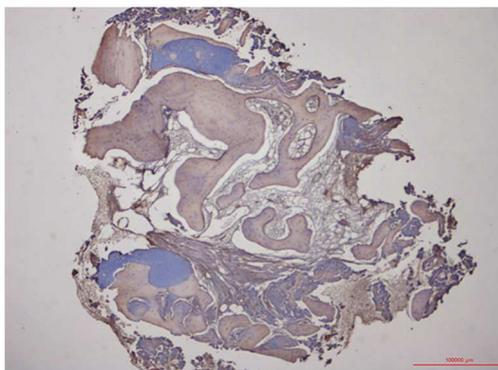


Figura 3.21

A: L'immagine mostra una panoramica della mappatura nella biopsia; colorazione immunohistochimica anti OPG, ingrandimento originale 5x (barra 250μm).

La marcatura presenta le medesime caratteristiche ed intensità del gruppo OA (Fig. 3.21).

Nelle immagini dei particolari è ben evidente la marcatura della lamella più recente entro i canali di Havers (Fig. 3.22A) e la notevole diffusione della marcatura negli spazi midollari (Fig. 3.22B) e in prossimità dei margini ossei.

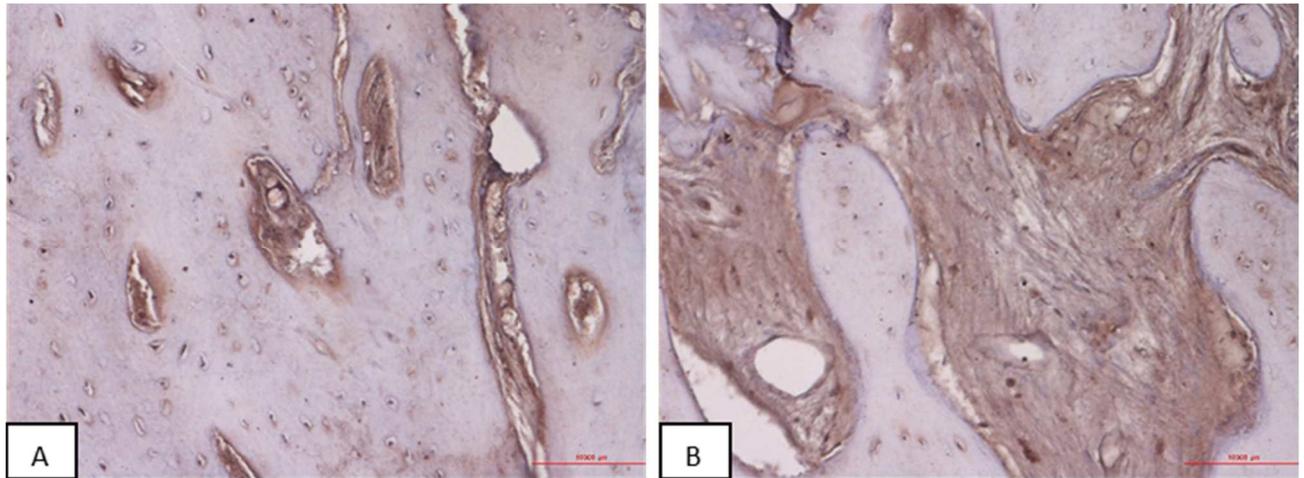


Figura 3.22

A, B: La marcatura risulta evidente in tutte le aree in cui vi è un attivo processo di neo-deposizione ossea, mineralizzazione e rimodellamento. In A si può osservare con la lamella più interna degli osteoni, cioè quella di più recente apposizione, sia marcata; in B la densa matrice attorno alle lamelle ossee, presenta una marcatura diffusa in tutta la matrice che diverrà tessuto osseo; colorazione immunohistochimica anti OPG, ingrandimento totale 200x (barra 100µm).

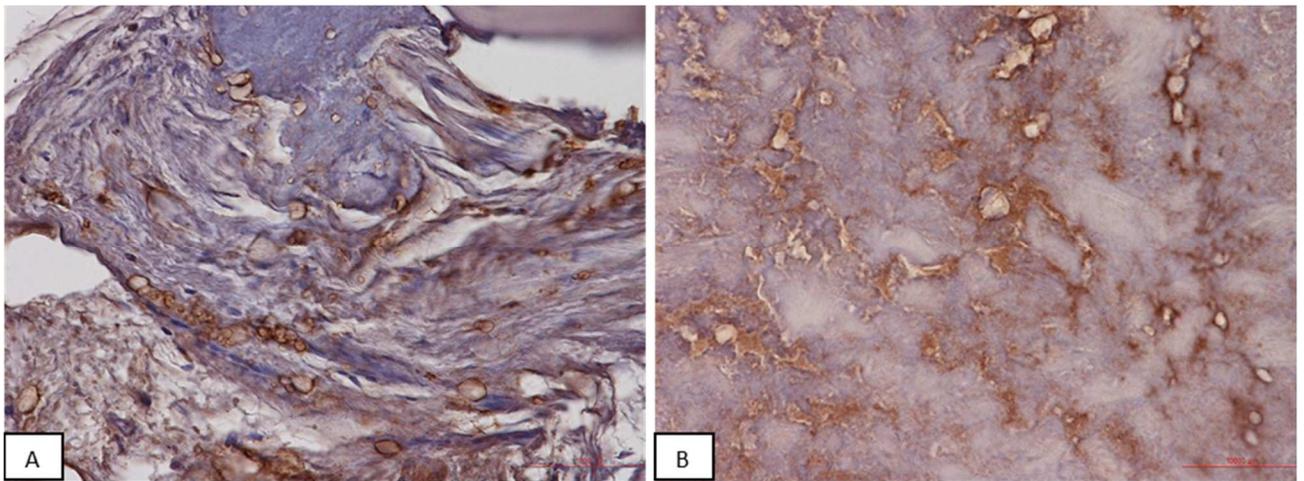


Figura 3.23

A: La marcatura è presente negli spazi midollari a ridosso delle porzioni di osso alamellare - woven bone; colorazione immunohistochimica anti OPG, ingrandimento totale 200x (barra 100µm);

B: La marcatura risulta evidente nell'osso in fase di formazione e in quelli che probabilmente diverranno canalicoli osteocitari e relative lacune ossee; colorazione immunohistochimica anti OPG, ingrandimento totale 400x (barra 30µm).

OPG- biomateriale (B)

Le modalità di distribuzione dell'OPG non presenta differenze con il gruppo OA e GS. Il biomateriale circondato da matrice osteoide e osso di neo apposizione non appare interessato dalla marcatura che d'altro canto risulta evidente nella porzione di tessuto destinato a diventare tessuto osseo.

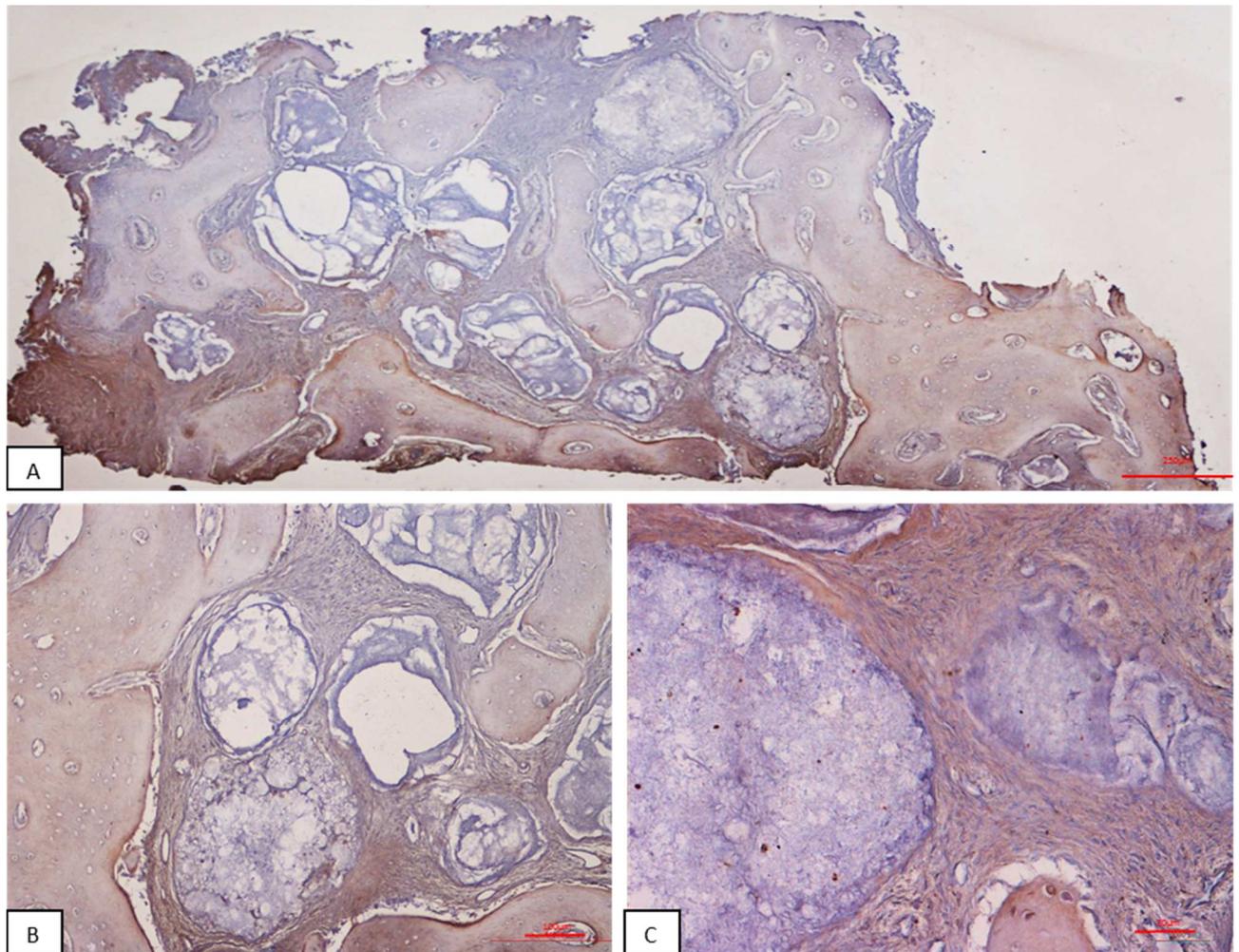


Figura 3.24

A: L'immagine mostra una panoramica della mappatura nella biopsia; colorazione immunocistochimica anti OPG, ingrandimento originale 5x (barra 250 μ m);

B, C: La marcatura si presenta nel tessuto attorno al biomateriale (B,C) e sui margini del tessuto osseo (B); colorazione immunocistochimica anti OPG, ingrandimento totale 200x (B) (barra 100 μ m), 400x (C) (barra 30 μ m).

Controllo negativo

Il controllo negativo è stato effettuato seguendo il protocollo della colorazione immunocistochimica, ma saltando il passaggio dell'anticorpo. Il risultato mostra che la DAB non ha colorato in maniera aspecifica in quanto, senza anticorpo, non vi è alcuna marcatura rilevabile, anche ad alti ingrandimenti.

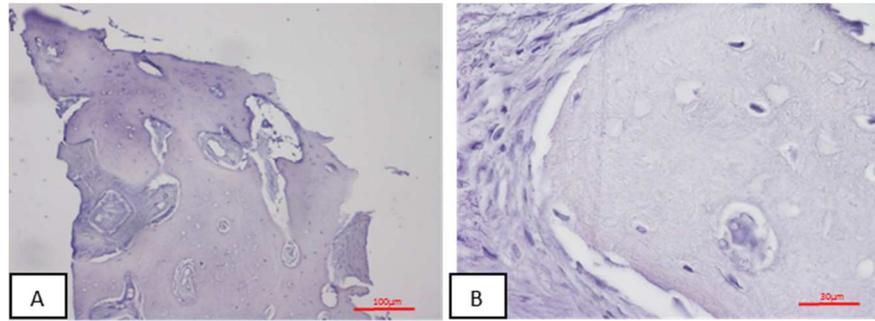


Figura 3.25

A, B: Controllo Negativo; colorazione con Ematossilina Mayer, ingrandimento totale 200x (A) (barra 100µm), 400x (B) (barra 30µm).

3.3.4- Valutazione istomorfometrica mediante stereologia

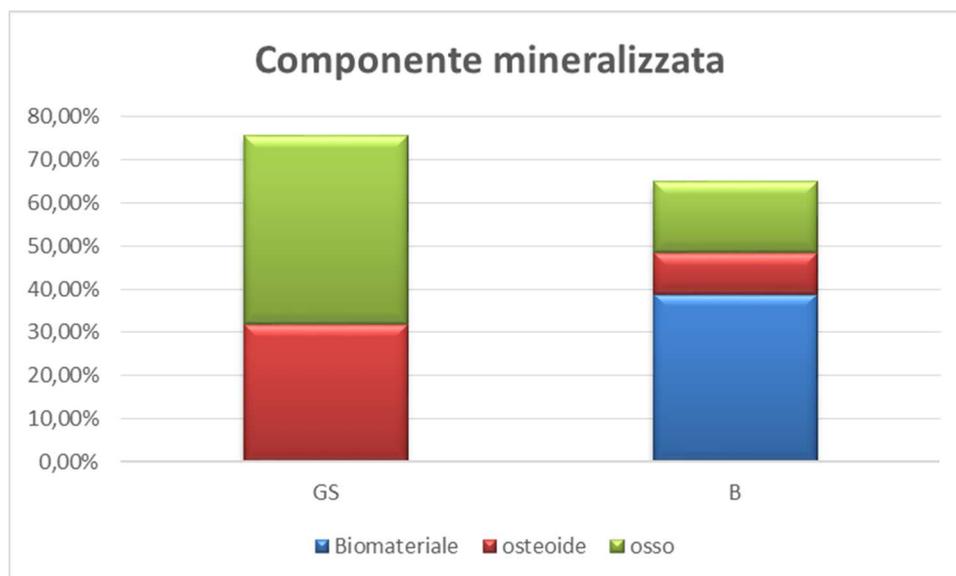


Figura 3.26

Il grafico mostra la percentuale media della componente mineralizzata.

Il grafico mostra come la somma di osteoide e osso neoformato (matrice mineralizzata) per il gruppo GS abbia un valore complessivo di 75,69% contro la somma della matrice mineralizzata e biomateriale nel gruppo B che risulta essere 65,02%.

I valori grezzi che descrivono le frazioni di volume del campione, ottenuti nel gruppo GS erano: 31,68% ± 5,32% per la matrice osteoide, 44,02% ± 7,39% per l'osso neoformato e 24,30% ± 5,58% per gli spazi midollari. Nel campioni B la media è risultata 38,83% ± 8,62% per il biomateriale, 9,67% ± 4,33% per la matrice osteoide, 16,49% ± 4,66% per l'osso di neoformazione e 34,98% ± 9,45% per gli spazi midollari.

Le figure 3.27 mostrano delle immagini di biopsie ossee in sezione longitudinale ottenuta per usura; dalla foto A possiamo osservare la grande quantità di tessuto osseo neoformato a differenti gradi di mineralizzazione (in blu osteoide e woven bone, mentre in marrone osso ad alto gradi di mineralizzazione); la foto B è caratterizzata da molti blocchetti di biomateriale circondato da osso di neoformazione. I blocchetti risultano essere ben osteointegrati senza aver dato problemi di flogosi e fibrointegrazione. Le immagini 3.28 rappresentano dei particolari ad ingrandimento maggiore della biopsia contenente biomateriale; questi particolari del campione mostrano come il biomateriale sia stato circondato da woven bone (A-C), mentre nella foto D si può notare un evidente presenza cellulare attorno al biomateriale.

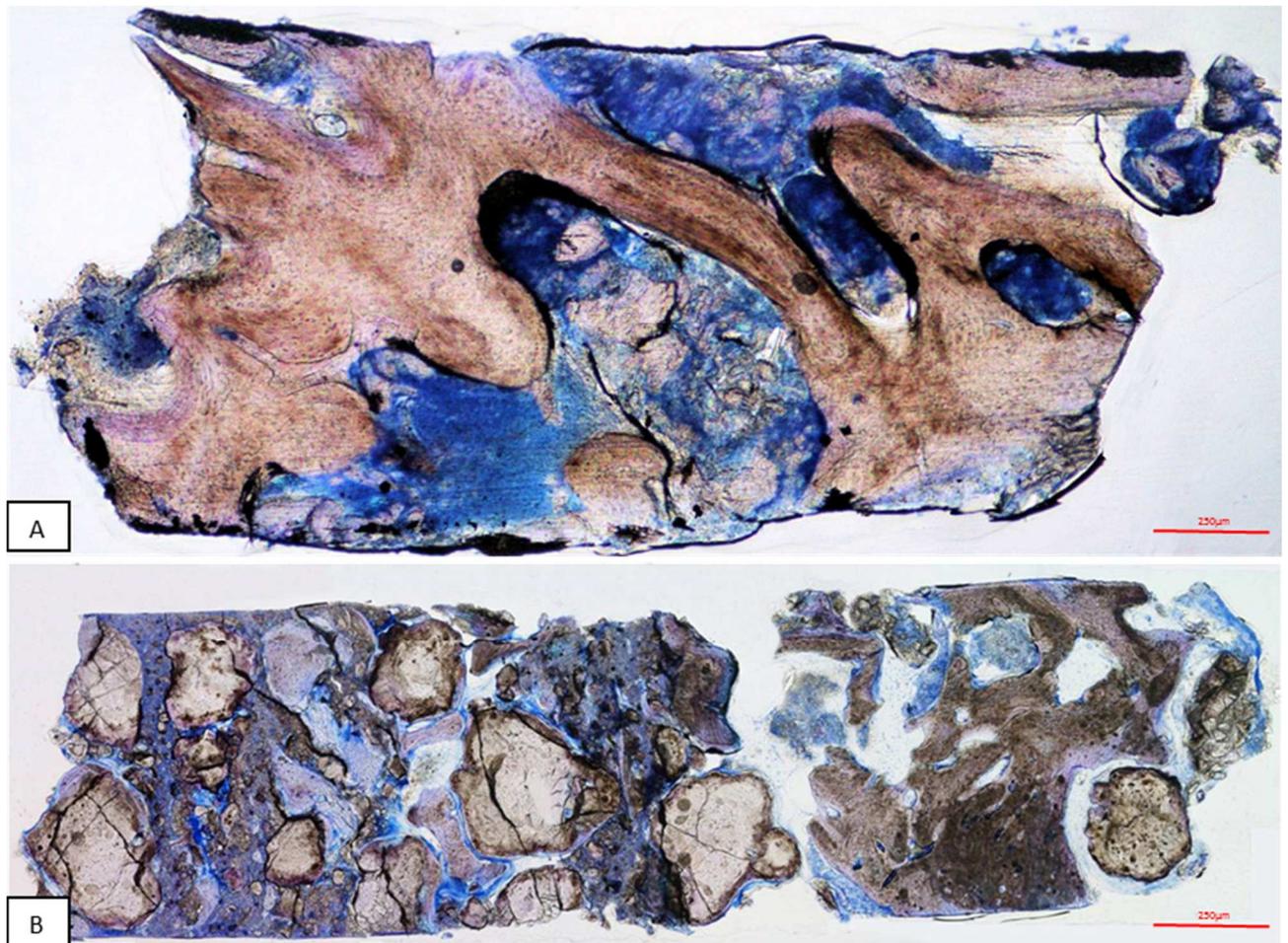


Figura 3.27

A: Biopsia ossea del gruppo GS ottenuta per usura; colorazione Blu di Toluidina e Pironina G, ingrandimento totale 20x (barra 250µm).

B: Biopsia ossea del gruppo B ottenuta per usura; colorazione Blu di Toluidina e Pironina G, ingrandimento totale 20x (barra 250µm).

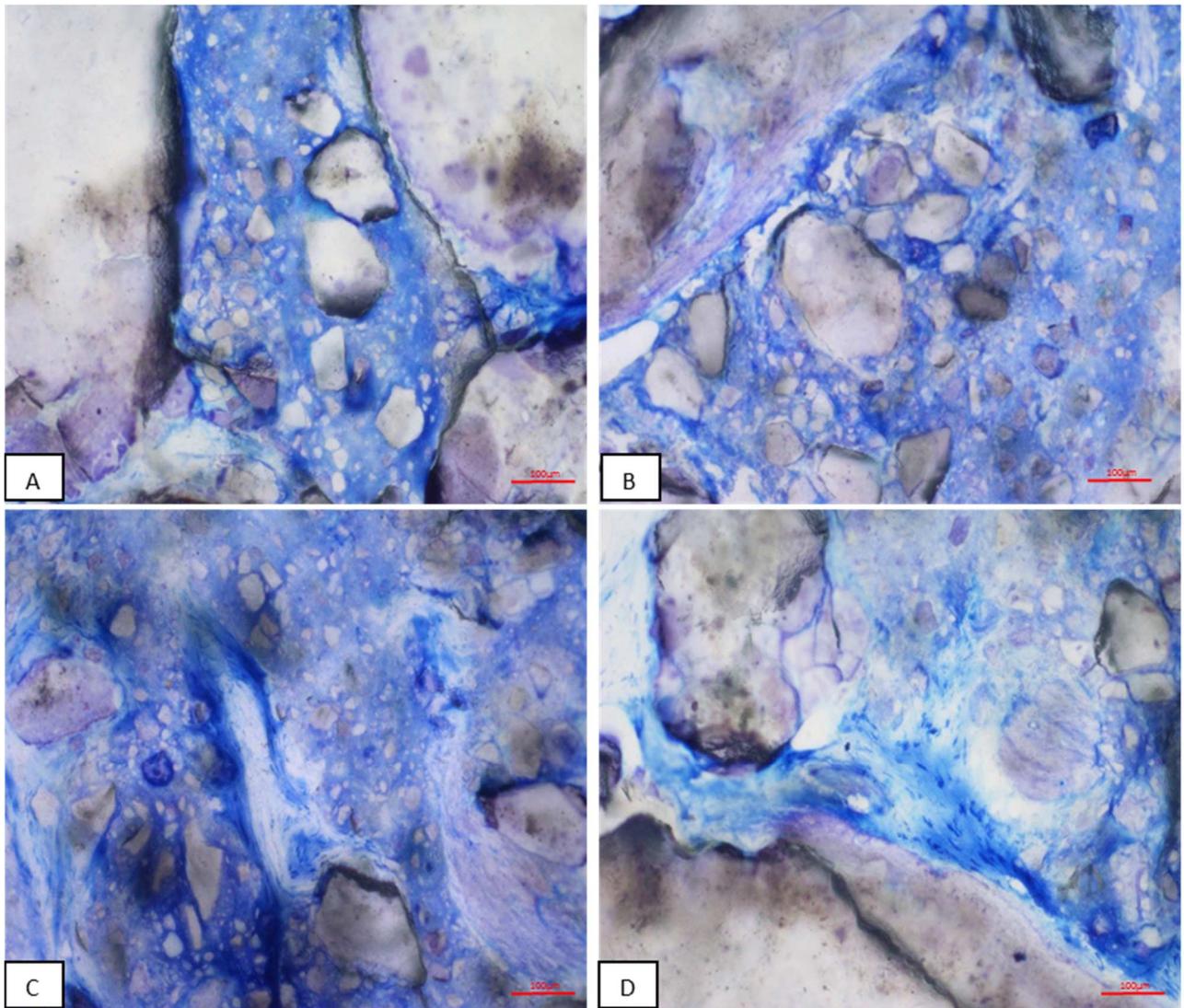


Figura 3.28

A-D: Particolari che mostrano il biomateriale circondato da osso neoformato; colorazione con Blu di Toluidina e Pironina G, ingrandimento totale 200x (barra 250µm).

3.3.5- Biologia molecolare: RT- PCR

I tre gruppi sono stati confrontati mediante test di Kruskal-Wallis che ha mostrato i seguenti risultati:

- ✓ TNF- α \rightarrow N.S.
- ✓ IL-6 \rightarrow $p \leq 0,05$
- ✓ RANK \rightarrow N.S.
- ✓ RANKL \rightarrow $p \leq 0,001$
- ✓ OPG \rightarrow $p \leq 0,001$

Successivamente è stato effettuato il test post hoc non parametrico di Wilcoxon della somma dei ranghi per campioni indipendenti, che ha mostrato una differenza statisticamente significativa per ($p \leq 0,05/3$),

tra il gruppo OA e B per IL-6 ($p \leq 0,01$), OA e GS per RANKL ($p \leq 0,001$) e OPG ($p \leq 0,001$) ed infine tra GS e B per IL-6 ($p \leq 0,01$), RANKL ($p \leq 0,01$) e OPG ($p \leq 0,001$).

L'analisi del grafico mostra l'andamento dell'espressione genica visualizzato in incremento o decremento percentuale rispetto al gruppo OA considerato come punto di partenza della variazione per gli altri due gruppi, in modo da poter rappresentare la variazione dell'espressione durante il processo di guarigione, rispetto ad una condizione di rimodellamento fisiologico.

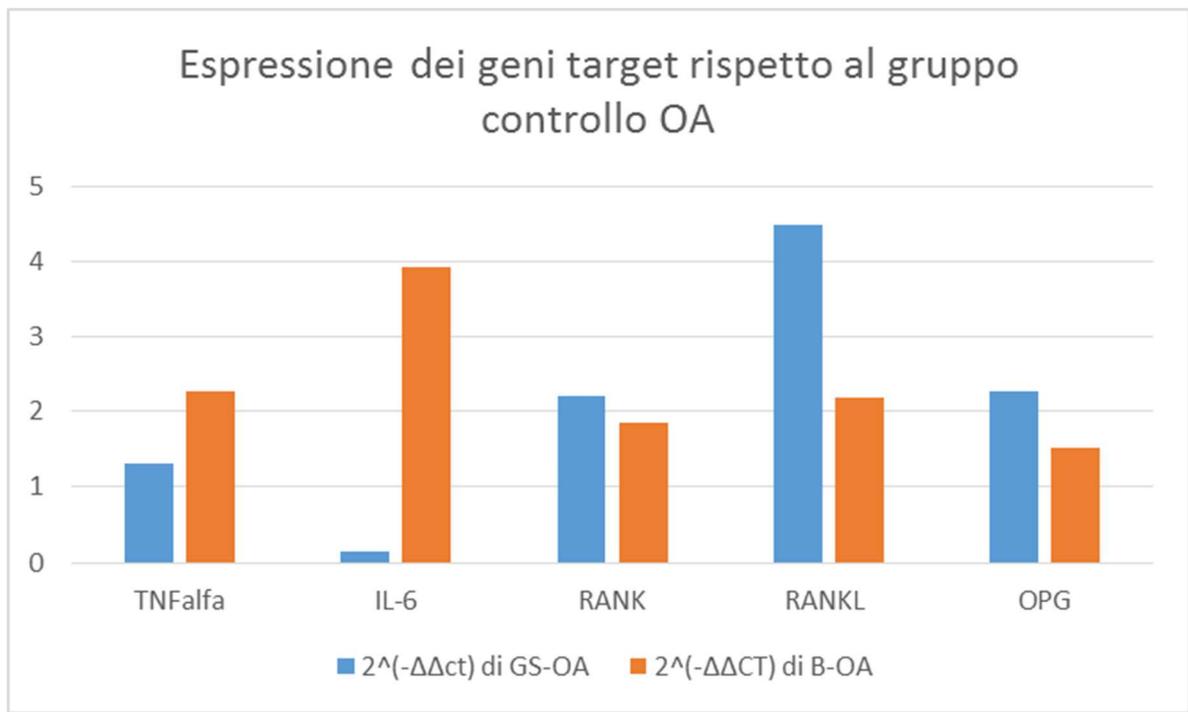


Figura 3.29

Il grafico rappresenta l'Expression Fold dei geni nei gruppi GS e B, rispetto al gruppo OA, considerato come campione controllo.

È stato calcolato il rapporto tra RANKL/OPG utilizzando i valori di espressioni ottenuti mediante la formula $2^{-\Delta\Delta CT}$ che sono risultati 1,99 per il gruppo GS contro 1,45 per il gruppo B. Questo indice suggerisce che, per valori >1 , vi è una tendenza da parte dei fattori del rimodellamento ad agire in senso osteoclastico.

DISCUSSIONE

Lo scopo di questo progetto di ricerca è stato quello di caratterizzare dal punto di vista morfologico e molecolare l'andamento del rimodellamento dell'osso alveolare prima e dopo avulsione dentale ed in presenza di un materiale alloplastico (Mg-HA).

SCELTA DEL MODELLO POST-ESTRATTIVO

Come testimoniato dal grande numero di studi clinici e sperimentali effettuati sia sul modello animale che su quello umano, esiste un grande interesse nel mantenere e preservare le caratteristiche morfologiche della cresta alveolare dopo l'estrazione dentaria, al fine di poter riabilitare la cresta edentula con la terapia impianto-protetica (Carmagnola et al. 2003; Cardaropoli et al. 2004; Ten Heggeler et al. 2010; Wang & Lang 2012; Crespi et al. 2009; Crespi et al. 2011).

Per scegliere la terapia più appropriata per ogni paziente, risulta cruciale lo studio del pattern di rimodellamento e di guarigione dell'osso alveolare. Il crescente interesse verso la preservazione dell'anatomia del sito post-estrattivo porta a far sì che questo modello sia l'ideale per la valutazione dei materiali biomimetici a scopo rigenerativo, come già osservato in molti studi sia dal punto di vista macroscopico (Araujo & Lindhe 2005; Caneva et al. 2011) che microscopico (Amler 1969; Evian 1982; Cardaropoli et al. 2003; Discepoli 2013). Nel nostro studio siamo riusciti ad ottenere una buona disponibilità di casi omogenei tra loro in termini di sito e tempistica nel prelievo.

BIOMATERIALE OGGETTO DI STUDIO

L'interesse per le idrossiapatiti biomimetiche è sempre più diffuso, grazie alle loro capacità di mimare le caratteristiche della superficie ossea naturale. Il biomateriale oggetto di studio è caratterizzato da idrossiapatite nano-strutturata contenente magnesio (Mg-e HA). A tal proposito, clinici e ricercatori hanno osservato le caratteristiche di questo materiale, che per la sua struttura chimica, dovrebbe possedere una maggior solubilità e quindi essere agevolato nel riassorbimento, mantenendo la propria funzione di scaffold nel periodo di guarigione (Crespi et al. 2009; Trombelli et al. 2010).

Durante la procedura clinica di preservazione alveolare, è fondamentale che i biomateriali possiedano l'intrinseca capacità di fare da scaffold (osteoconduttivo). In questo contesto, nel nostro stesso modello sperimentale sono state valutate differenti formulazioni di Mg-e HA sia nell'ambito clinico che a livello morfologico (Crespi et al. 2009; Crespi et al. 2011; Caneva et al. 2011). Caneva et al. 2011 hanno mostrato le potenzialità di Mg-e HA nella preservazione alveolare, valutando le caratteristiche dimensionali ed anatomiche del profilo della cresta e l'osteointegrazione di impianti inseriti nel sito da riabilitare. Lo studio è stato condotto su 6 cani dove il sito test è stato rigenerato con l'ausilio del materiale alloplastico, mentre nei siti di controllo la rigenerazione è avvenuta spontaneamente, prima della riabilitazione implantare.

Alla fine dei 4 mesi di guarigione, si è osservato un riassorbimento osseo della cresta sia nei siti test che in quelli controllo; nei siti test la cresta si è mantenuta ad un livello leggermente più alto (perdita di circa 0,7 mm) rispetto ai siti controllo (perdita di circa 1,2 mm), dimostrando l'efficacia dell'azione riempitiva del biomateriale.

Canullo et al. 2013 hanno utilizzato Mg-e HA (SintLife®) in uno studio prettamente istologico e morfologico valutando il rimodellamento (colorazione tricromica di Masson-Goldner, colorazione immunoistochimica anti-fosfatasi alcalina), la presenza di osteoclasti (colorazione TRAP) e l'angiogenesi (colorazione immunoistochimica anti-CD34 e anti-caveolina-1) nelle fasi precoci di guarigione di alveoli post-estrattivi. Sono stati presi in considerazione 10 siti post-estrattivi interessati da metodica di preservazione dell'alveolo dividendoli in due gruppi bilanciati tramite randomizzazione. Le biopsie sono state effettuate 2 o 4 mesi dopo la chirurgia. L'analisi istomorfometrica ha rivelato una rigenerazione ossea del 15% dopo 2 mesi e un incremento di questa al 77,4% al quarto mese. Al contrario, la presenza di vasi capillari nel sito è decresciuta (analizzando la marcatura della caveolina-1), dato confermato dall'espressione di CD34. Questo materiale risulta quindi dotato di buone proprietà, in particolare, assicura le fasi più precoci dell'osteogenesi e dell'angiogenesi, fenomeni alla base della guarigione alveolare.

Crespi et al. 2009, in uno studio in 15 pazienti ai quali è stato effettuato uno "split mouth design", hanno valutato la rigenerazione mediata da innesto con osso autologo o Mg-e HA. Dopo 5 mesi di guarigione sono state effettuate sia le analisi morfologiche che molecolari. I risultati sono in accordo con alcuni dati ottenuti nel nostro studio come un'aumentata espressione di RANKL nel gruppo innestato con osso autologo rispetto al gruppo B e una produzione simile del fattore OPG.

ANALISI DEI BIOMARKER

Dall'analisi immunoistochimica si è visto che l'aumento dei biomarkers analizzati è coerente con una situazione di rimodellamento sia nel gruppo "guarigione spontanea" che nel gruppo "biomateriale" rispetto alla condizione baseline fisiologica del gruppo "osso alveolare". Il rimodellamento post-estrattivo avviene prima attraverso la produzione di citochine pro-infiammatorie (TNF-alfa e IL-6) che a loro volta agiscono in sinergia per innescare il pattern RANK-RANKL che si traduce nell'attivazione degli osteoclasti (Lam et al. 2000; Lu et al. 2006; Boyce & Xing 2007).

TNF- α e IL-6

IL-6 si presenta aumentata rispetto al gruppo OA sia in GS che, in particolar modo, in B. L'idrossiapatite è un materiale che velocizza l'attivazione dei fattori di rimodellamento osseo nella fase precoce di guarigione (Tonino et al. 2009). Tonino et al. hanno valutato che una protesi d'anca ricoperta da uno strato di idrossiapatite (*coating*) migliora l'incipit iniziale del processo mantenendo attivo il sistema che rimane

comunque elevato nel tempo; infatti dopo 8 anni dall'inserimento della protesi il coating dell'impianto era stato completamente riassorbito. Questo potrebbe spiegare come, a contatto con HA, i valori di IL-6 siano statisticamente più elevati rispetto al gruppo in cui la guarigione è avvenuta spontaneamente. Il nostro gruppo aveva già valutato in uno studio in vitro (Canciani 2009-10) il seguente comportamento in una coltura di pre-osteoblasti MC3T3-E1 a contatto con un dischetto di titanio ricoperto con HA. Il test ELISA, effettuato su terreno di coltura dopo 21 giorni, aveva mostrato un'elevata presenza della citochina rispetto ai terreni di altre tipologie di funzionalizzazione. Il risultato di questo test non risultava di facile interpretazione ma può comunque suggerire che le cellule a contatto col titanio con coating di HA sviluppino un'elevata quantità di IL-6 e, quindi, potrebbero indurre in vivo un notevole rimodellamento.

TNF- α è una potente citochina infiammatoria che come IL-6 media il processo di osteoclastogenesi (Kwan et al. 2004). Nel nostro studio, sia dall'analisi immunostochimica che dell'espressione genica, abbiamo osservato che il fattore risultava essere leggermente aumentato nel gruppo B rispetto agli altri due. Dato l'aumento significativo di IL-6, era prevedibile un incremento, anche non eccessivo, di questa citochina; Kurokouchi et al. 1998 hanno dimostrato che TNF- α stimola la produzione di IL-6 agendo sugli osteoblasti. Molti studiosi affermano, inoltre, che gli aumenti di IL-6, IL-1 e TNF- α debbano avvenire in concerto, poiché quest'ultima non sarebbe in grado autonomamente e direttamente di agire sull'attivazione degli osteoclasti e quindi sulla produzione di RANKL (Fujikawa et al. 2001). D'altro canto si è visto che TNF- α promuove l'osteoclastogenesi anche mediante un meccanismo indipendente da RANK; infatti Sabokbar et al. 2003 hanno osservato, in uno studio in vitro, che TNF- α in presenza di M-CSF stimola la formazione di osteoclasti senza l'interazione di RANKL/RANK. Il lieve aumento riscontrato è quindi in linea con qualsiasi meccanismo ne abbia regolato l'aumento.

TNF- α , RANK, RANKL e OPG

TNF- α ha un'azione diretta su RANKL nell'osteoclastogenesi, come osservato da Komine et al. 2001 in uno studio in vitro dove cellule osteoclastiche si differenziavano a partire da cellule di midollo osseo. TNF- α e RANKL agiscono in sinergia per up-regolare RANK (Kwan et al. 2004). I nostri risultati mostrano che l'espressione proteica nei gruppi GS e B ha subito un incremento rispetto al gruppo OA sia per la citochina RANK che per RANKL (statisticamente significativo, nell'analisi immunostochimica tra i gruppi OA e B), confermando che la guarigione e l'attivazione del pattern di rimodellamento non ha subito significative modificazioni legate alla presenza del biomateriale.

La nostra tesi viene altresì supportata dai risultati ottenuti dal marcatore di neo-deposizione ossea (OPG) che ha mostrato all'analisi immunostochimica un andamento simile al gruppo OA per i gruppi in fase di guarigione. Essendo un antagonista di RANKL (Kwan et al. 2004; Hollinger et al. 2011), si può presumere che un incremento di uno possa calmierare l'espressione (che si è mantenuta costante per tutti e 3 i

gruppi senza nessuna differenza) e la traduzione proteica dell'antagonista. TNF- α e IL-6 agiscono come attivatori dell'osteoclastogenesi, ma possono attivare anche OPG, al fine di poter mantenere un equilibrio nel processo di rimodellamento (Ragab et al. 2002).

RATIO RANKL/OPG

Il rapporto RANKL /OPG è un indicatore di neoformazione ossea e di attività di riassorbimento. Si evince che per entrambi i gruppi vi è una lieve propensione all'attività osteoclastica rispetto a quella di neo deposizione. Nel gruppo con biomateriale il processo di riassorbimento appare rallentato in accordo con quanto osservato da Crespi et al. 2009.

OSTEOINTEGRAZIONE E MATRICE MINERALIZZATA

È stato dimostrato che gli innesti autologhi provocano la formazione di maggiori quote di osso vitale rispetto alla Mg-e HA dopo 5 mesi di guarigione, ma il nuovo biomateriale ha rivelato di non alterare l'espressione dei markers di differenziazione osteoblastica e deposizione ossea con una leggera depressione del potenziale osteoclastogenico (Crespi et al. 2009). Mediante un confronto tra un gruppo test innestato con Mg-e HA, e un gruppo controllo innestato con solfato di calcio, Crespi et al. hanno inoltre osservato la capacità del gruppo test di ridurre il riassorbimento osseo, ma anche di lasciare nel sito maggiori quantità di biomateriale residuo e minori quantità di osso vitale rispetto al materiale controllo (Crespi et al. 2009). Le nostre sezioni per usura mostrano che i granuli di Mg-HA erano ben integrati e a stretto contatto con il tessuto di guarigione circostante, come riportato in altri studi (Canullo et al. 2013); il materiale ha positivamente risposto a corrette caratteristiche di biocompatibilità, dando conferme sulla potenzialità di partecipazione alla guarigione e al rimodellamento osseo grazie anche alla mancanza di incapsulamenti fibrotici dei granuli di innesto (Luttikhuisen et al. 2006; Araujo et al. 2009).

CONCLUSIONE

Rispetto al rimodellamento fisiologico tutti i marker indagati hanno mostrato un incremento in entrambi i gruppi in fase di guarigione dell'alveolo post-estrattivo. Nei siti trattati con il biomateriale si è osservato un aumento delle citochine IL-6 e TNF- α e una leggera diminuzione di RANK e RANKL, rispetto alla guarigione spontanea. Questo può significare un rallentamento della ricostituzione del sito anatomico, dovuto ad una possibile down-regulation dell'osteoclastogenesi. Tuttavia, l'analisi della struttura dell'alveolo ha mostrato una buona rigenerazione ossea in entrambi i gruppi; pertanto il biomateriale analizzato può essere considerato un valido ausilio per la preservazione dell'alveolo post-estrattivo.

LIMITI DELLO STUDIO E PROSPETTIVE FUTURE

Questo studio può essere considerato “pilota”, sia per la validazioni delle tecniche utilizzate che per il gruppo ristretto di campioni. Uno studio biologico e di caratterizzazione di un pattern complesso come quello preso in esame avrebbe bisogno di essere supportato da grandi numeri, al di fine di poter trovare forti differenze tra i gruppi presi in esame che permetterebbero di fornire indicazioni certe sull’andamento del pattern di rimodellamento.

In seguito, questo lavoro potrebbe continuare sia reclutando una popolazione più ampia, sia testando mediante altre tipologie di analisi i marker studiati, in particolare IL-6, che viene sempre più utilizzata come marker anche diagnostico in numerosi processi biologici.

BIBLIOGRAFIA

Amler MH. The time sequence of tissue regeneration in human extraction wounds. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1969; 27(3):309-318.

Anderson DM, Maraskovsky E, Billingsley WL, Dougall WC, Tometsko ME, Roux ER, Teepe MC, DuBose RF, Cosman D, Galibert L. A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature.* 1997; 390(6656):175-179.

Araújo M, Linder E, Lindhe J. Effect of a xenograft on early bone formation in extraction sockets: an experimental study in dog. *Clin Oral Implants Res.* 2009; 20:1-6.

Araújo MG & Lindhe J. Dimensional ridge alterations following tooth extraction. An experimental study in the dog. *J Clin Periodontol.* 2005; 32(2):212-218.

Barrientos S, Stojadinovic O, Golinko MS, Brem H, Tomic-Canic M. Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair Regen.* 2008; 16(5):585-601.

Bauer TW, Muschler GF. Bone graft materials. An overview of the basic science. *Clin Orthop Relat Res.* 2000; 371:10-27.

Bingham 3rd CO. The pathogenesis of rheumatoid arthritis: pivotal cytokines involved in bone degradation and inflammation. *J Rheumatol Suppl.* 2002; 65:3-9.

Blanchard F, Duplomb L, Baudhuin M, Brounais B. The dual role of IL-6 type cytokines on bone remodelling and bone tumours. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2009; 20(1):19-28.

Boyce BF & Xing L. The RANKL/RANK/OPG pathway. *Curr Osteoporos Rep.* 2007; 5(3):98-104.

Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature.* 2003; 423:337-342.

Boyne, P.J. Osseous repair of the post-extraction alveolus in man. *Oral surgery, oral medicine, and oral pathology.* 1966; 21: 805-813.

Brånemark PI, Zarb GA, Albrektsson T. *Tissue-integrated protheses: osseointegration in clinical dentistry.* Chicago: Quintessence Publishing Co; 1985.

Canciani E. Valutazione comparativa dell'osteointegrazione in relazione a modifiche di superficie di impianti in titanio. Tesi di Laurea specialistica, anno 2009-10.

Cardaropoli G, Araújo M, Lindhe J. Dynamics of bone tissue formation in tooth extraction sites. An experimental study in dogs. *J Clin Periodontol.* 2003; 30:809-818.

Carmagnola D, Adriaens P, Berglundh T. Healing of human extraction sockets filled with Bio-Oss®. *Clin Oral Implant Res.* 2003; 14:137-143.

Chiapasco M, Casentini P, Zaniboni M. Bone augmentation procedures in implant dentistry. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2009; 24 (Supp.):237-259.

Chiapasco M, Zaniboni M, Boisco M. Augmentation procedures for the rehabilitation of deficient edentulous ridges with oral implants. *Clin Oral Implants Res.* 2006; 17 (Supp.2):136-159.

Contar CM, Sarot JR, Bordini J Jr, Galvão GH, Nicolau GV, Machado MA. Maxillary ridge augmentation with fresh-frozen bone allografts. *J Oral Maxillofac Surg.* 2009; 67(6):1280-1285.

Crespi R, Capparè P, Gherlone E. Comparison of magnesium-enriched hydroxyapatite and porcine bone in human extraction socket healing: a histologic and histomorphometric evaluation. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2011; 26(5):1057-1062.

Crespi R, Capparè P, Gherlone E. Radiographic evaluation of marginal bone levels around platform-switched and non-platform-switched implants used in an immediate loading protocol. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2009; 24(5):920-926.

Crespi R, Capparè P, Romanos GE, Mariani E, Benasciutti E, Gherlone E. Corticocancellous porcine bone in the healing of human extraction sockets: combining histomorphometry with osteoblast gene expression profiles in vivo. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2011; 26(4):866-872.

Crespi R, Mariani E, Benasciutti E, Capparè P, Cenci S, Gherlone E. Magnesium-enriched hydroxyapatite versus autologous bone in maxillary sinus grafting: combining histomorphometry with osteoblast gene expression profiles ex vivo. *J Periodontol.* 2009; 80(4):586-593.

De la Mata J, Uy HL, Guise TA, Story B, Boyce BF, Mundy GR, Roodman GD. Interleukin-6 enhances hypercalcemia and bone resorption mediated by parathyroid hormone-related protein in vivo. *J Clin Invest.* 1995; 95:2846-2852.

Devlin RD, Reddy SV, Savino R, Ciliberto G, Roodman D. IL-6 mediates the effects of IL-1 or TNF, but not PTHrp or 1,25(OH)2D3, on osteoclast-like cell formation in normal human bone marrow cultures. *J Bone Miner Res.* 1998; 13:393-399.

Di Stefano DA & Cazzaniga A. Chirurgia ossea ricostruttiva pre- e post-implantare. Elsevier-Masson, Milano 2008; 136-141.

Dinarelli CA. The interleukin-1 family: 10 years of discovery. *FASEB J.* 1994; 8:1314-1325.

Discepoli N, Vignoletti F, Laino L, de Sanctis M, Muñoz F, Sanz M. Early healing of the alveolar process after tooth extraction: an experimental study in the beagle dog. *J Clin Periodontol.* 2013; 40(6):638-644.

Donath K, Breuner G. A method for the study of undecalcified bones and teeth with attached soft tissues. The Säge-Schliff (sawing and grinding) technique. *J Oral Pathol.* 1982; 11(4):318-326.

Ducy P, Schinke T, Karsenty G. The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance. *Science.* 2000; 289:1501-1504.

Dunstan CR, Blair JM, Zhou H. Bone, mineral, connective tissue metabolism. *Comprehensive Medicinal Chemistry II.* 2007; 6:495-520.

Esposito M, Grusovin MG, Coulthard P, Worthington HV. The efficacy of various bone augmentation procedures for dental implants: a Cochrane systematic review of randomized controlled clinical trials. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2006; 21(5):696-710.

Esposito M, Grusovin MG, Felice P, Karatzopoulos G, Worthington HV, Coulthard P. The efficacy of horizontal and vertical bone augmentation procedures for dental implants - a Cochrane systematic review. *Eur J Oral Implantol.* 2009; 2(3):167-184.

Evian CI, Rosenberg ES, Coslet JG, Corn H. The osteogenic activity of bone removed from healing extraction sockets in humans. *J Periodontol.* 1982; 53(2):81-85.

Feneis H. Anatomy and physiology of the normal gingiva. *Dtsch Zahnarztl Z.* 1952; 7:467-476.

Fini M, Carpi A, Borsari V, Tschon M, Nicolini A, Sartori M, Mechanick J, Giardino R. Bone remodeling, humoral networks and smart biomaterial technology for osteoporosis. *Front Biosci (Schol Ed).* 2010; 2:468-482.

Fujikawa Y, Sabokbar A, Neale SD, Itonaga I, Torisu T, Athanasou NA. The effect of macrophage-colony stimulating factor and other humoral factors (interleukin-1, -3, -6, and -11, tumor necrosis factor-alpha, and granulocyte macrophage-colony stimulating factor) on human osteoclast formation from circulating cells. *Bone.* 2001; 28(3):261-267.

Giannobile WV, Finkelman RD, Lynch SE. Comparison of canine and non-human primate animal models for periodontal regenerative therapy: results following a single administration of PDGF/IGF-I. *J Periodontol.* 1994; 65:1158-1168.

Goldring SR. Inflammatory mediators as essential elements in bone remodeling. *Calcif. Tissue Int.* 2003; 73:97-100.

Grimaud E, Soubigou L, Couillaud S, Coipeau P, Moreau A, Passuti N, Gouin F, Redini F, Heymann D.

Hattersley G, Dorey E, Horton MA, Chambers TJ. Human macrophage colony-stimulating factor inhibits bone resorption by osteoclasts disaggregated from rat bone. *J Cell Physiol.* 1988; 137:199-203.

Heymann D & Rousselle AV. gp130 Cytokine family and bone cells. *Cytokine.* 2000; 12(10):1455-1468.

Hollinger JO, Srinivasan A, Alvarez P, Hsu E, McBride S. *Bone Tissue Engineering: Growth Factors and Cytokines.* Elsevier-Masson. 2011; 281-300.

Khosla S. Minireview: The OPG/RANKL/RANK System. *Endocrinology.* 2001; 142(12):5050-5055.

Komine M, Kukita A, Ogata Y, Hotokebuchi T, Kohashi O. Tumour necrosis factor-alpha cooperates with receptor of nuclear factor kappaB ligand in generation of osteoclasts in stromal cell-depleted rat bone marrow cell culture. *Bone.* 2001; 28:474-483.

Kudo O, Fujikawa Y, Itonaga I, Sabokbar A, Torisu T, Athanasou NA. Proinflammatory cytokine (TNF-alpha/IL-1alpha) induction of human osteoclast formation. *J Pathol.* 2002; 198:220-227.

Kuhihara N, Bertolini D, Suda T, Akiyama Y, Roodman GD. IL-6 stimulates osteoclast-like multinucleated cell formation in long term human marrow cultures by inducing IL-1 release. *J Immunol.* 1990; 144:4226-4230.

Kurokouchi K, Kambe F, Yasukawa K, Izumi R, Ishiguro N, Iwata H, Seo H. TNF-alpha increases expression of IL-6 and ICAM-1 genes through activation of NF-kappaB in osteoblast-like ROS17/2.8 cells. *J Bone Miner Res.* 1998; 13(8):1290-1299.

Kwan Tat S, Padrines M, Théoleyre S, Heymann D, Fortun Y. IL-6, RANKL, TNF-alpha/IL-1: interrelations in bone resorption pathophysiology. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2004; 15(1):49-60.

Lam J, Takeshita S, Barker JE, Kanagawa O, Ross FP, Teitelbaum SL. TNF-alpha induces osteoclastogenesis by direct stimulation of macrophages exposed to permissive levels of RANK ligand. *J Clin Invest.* 2000; 106(12):1481-1488.

Leibbrandt A & Penninger JM. RANK/RANKL: regulators of immune responses and bone physiology. *Ann N Y Acad Sci.* 2008; 1143:123-150.

Lekovic V, Camargo PM, Klokkevold PR, Weinlaender M, Kenney EB, Dimitrijevic B, Nedic M. Preservation of alveolar bone in extraction sockets using bioabsorbable membranes. *J Periodontol.* 1998; 69:1044-1049.

Lindhe J, Lang NP, Karring T. *Parodontologia clinica e Implantologia orale.* Edi. Ermes, Milano 2010; 1:3-48, 86-93.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001; 25(4):402-408.

Lorenzo JA. The role of cytokines in the regulation of local bone resorption. *Crit Rev Immunol.* 1991; 11(3-4):195-213.

Lorenzon G. *Implantologia funzionale dalla Osteointegrazione alla Fisiointegrazione.* Ed Martina, Bologna, 2010; 5:39-47.

Lu HK, Chen YL, Chang HC, Li CL, Kuo MY. Identification of the osteoprotegerin/receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand system in gingival crevicular fluid and tissue of patients with chronic periodontitis. *J Periodontal Res.* 2006; 41(4):354-360.

Luttikhuisen DT, Harmsen MC, Van Luyn MJ. Cellular and molecular dynamics in the foreign body reaction. *Tissue Eng.* 2006; 12:1955-1970.

Luvizuto ER, Queiroz TP, Dias SM, Okamoto T, Dornelles RC, Garcia IR Jr, Okamoto R. Histomorphometric analysis and immunolocalization of RANKL and OPG during the alveolar healing process in female ovariectomized rats treated with oestrogen or raloxifene. *Arch Oral Biol.* 2010; 55(1):52-59.

Macchi A, Mangano C, Inversini M, Norcini A, Binaghi E. Scaffolds individualizzati (Custom Made) nella rigenerazione ossea dei mascellari. *Implantologia Orale.* 2006; 4:7-15.

Macedo RM, Lacerda SA, Brentegani LG, Bombonato-Prado KF, Prata CA. Osteointegration of autogenous bone graft associated with osteoblastic cells under treatment with caffeine. *Implant Dent.* 2011; 20(5):369-373.

Matsuo K, Irie N. Osteoclast-osteoblast communication. *Arch Biochem Biophys.* 2008; 473(2):201-209.

Mecall RA & Rosenfeld AL. Influence of residual ridge resorption patterns on implant fixture placement and tooth position. 1. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 1991; 11(1):8-23.

Nemcovsky CE & Serfaty V. Alveolar ridge preservation following extraction of maxillary anterior teeth. Report on 23 consecutive cases. *J Periodontol.* 1996; 67:390-395.

Nyström E, Ahlqvist J, Gunne J, Kahnberg KE. 10-year follow-up of onlay bone grafts and implants in severely resorbed maxillae. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2004; 33(3):258-262.

Pellegrini G, Seol YJ, Gruber R & Giannobile WV. Pre-clinical Models for Oral and Periodontal Reconstructive Therapies. *J Dent Res.* 2009; 88:1065-1076.

Pivodova V, Frankova J, Ulrichova J. Osteoblast and gingival fibroblast markers in dental implant studies. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2011; 155(2):109-116.

Ragab AA, Nalepka JL, Bi Y, Greenfield EM. Cytokines synergistically induce osteoclast differentiation: support by immortalized or normal calvarial cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2002; 283(3):679-687.

Raisz LG. Physiology and pathophysiology of bone remodeling. *Clin. Chem.* 1999; 45:1353-1358.

Rasperini G, Canullo L, Dellavia C, Pellegrini G, Simion M. Socket grafting in the posterior maxilla reduces the need for sinus augmentation. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 2010; 30(3):265-273.

Receptor activator of nuclear factor kappaB ligand (RANKL)/osteoprotegerin (OPG) ratio is increased in severe osteolysis. *Am J Pathol.* 2003; 163(5):2021-2031.

Riethe P. Changes in the surface structure of the attached gingiva in young and old subjects. *Dtsch Zahnärztl Z.* 1965; 20(9):1028-1035.

Sabokbar A, Kudo O, Athanasou NA. Two distinct cellular mechanisms of osteoclast formation and bone resorption in periprosthetic osteolysis. *J Orthop Res* 2003; 21:73-80.

Spin-Neto R, Stavropoulos A, Pereira LA, Marcantonio E Jr, Wenzel A. Fate of autologous and fresh-frozen allogeneic block bone grafts used for ridge augmentation. A CBCT-based analysis. *Clin Oral Implants Res.* 2013; 24(2):167-173.

Tan WL, Wong TLT, Wong MCM, Lang NP. A systematic review of post-extraction alveolar hard and soft tissue dimensional changes in humans. *Clin Oral Impl Res.* 2012; 23(Supp.5):1-21.

Teitelbaum S.L. Bone resorption by osteoclast. *Science.* 2000; 289:1504-1508.

Ten Heggeler JM, Slot DE, Van der Weijden GA. Effect of socket preservation therapies following tooth extraction in non-molar regions in humans: a systematic review. *Clin Oral Implants Res.* 2011; 22(8):779-788.

Tonino AJ, van der Wal BC, Heyligers IC, Grimm B. Bone remodeling and hydroxyapatite resorption in coated primary hip prostheses. *Clin Orthop Relat Res.* 2009; 467(2):478-484.

Trombelli L & Farina R. Clinical outcomes with bioactive agents alone or in combination with grafting or guided tissue regeneration. *J Clin Periodontol.* 2008; 35(Supp.8):117-135.

Trombelli L, Penolazzi L, Torreggiani E, Farina R, Lambertini E, Vecchiatini R, Piva R. Effect of hydroxyapatite-based biomaterials on human osteoblast phenotype. *Minerva Stomatol.* 2010; 59:103-115.

Udagawa N, Takahashi N, Katagiri T, Tamura T, Wada S, Finlay DM, Martin TJ, Hirota H, Taga T, Kishimoto T, Suda T. Interleukin (IL)-6 induction of osteoclast differentiation depends on IL-6 receptors expressed on osteoblastic cells but not on osteoclast progenitors. *J Exp Med.* 1995; 182:1461-1468.

Vignoletti F, Matesanz P, Rodrigo D, Figuero E, Martin C, Sanz M. Surgical protocols for ridge preservation after tooth extraction. A systematic review. *Clin Oral Implants Res.* 2012; 5(Supp.23):22-38.

Wang RE, Lang NP. Ridge preservation after tooth extraction. *Clin Oral Implants Res.* 2012; 23(Supp. 6):147-156.

Zhang YH, Heulsmann A, Tondravi MM, Mukherjee A, Abu-Amer Y. Tumor necrosis factor-alpha (TNF) stimulates RANKL-induced osteoclastogenesis via coupling of TNF type I receptor and RANK signalling pathways. *J Biol Chem.* 2001; 276: 563-568.

Zubillaga G, Von Hagen S, Simon BI, Deasy MJ. Changes in alveolar bone height and width following post-extraction ridge augmentation using a fixed bioabsorbable membrane and demineralized freeze-dried bone osteoinductive graft. *J Periodontol.* 2003; 74(7):965-975.